

Institut für Ernährungswissenschaft
Justus-Liebig-Universität Gießen

**Untersuchungen zur Wirkung von Anthocyanen auf die
mikrobielle Metabolisierung von Lactose-[¹³C]-Ureid und
Lactose-[¹⁵N₂]-Ureid im Colon des Menschen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades am Fachbereich
Agrarwissenschaften, Ökotropologie und Umweltmanagement der
Justus-Liebig-Universität

Vorgelegt von
Georg Abel (M.Sc.)

Gießen 2014

Gutachter

1. Gutachter: Prof. Dr. Clemens Kunz, Institut für Ernährungswissenschaft,
Justus-Liebig-Universität Gießen
2. Gutachter: Prof. Dr. Eugen Domann, Institut für medizinische Mikrobiologie,
Justus-Liebig-Universität Gießen

Disputation am 04.08.2014

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Clemens Kunz für das mir entgegengebrachte Vertrauen und den Freiraum zur Mitarbeit im BMBF Verbundprojekt ANTHONIA (BMBF 0315379A). Seine immerwährende Unterstützung und Motivierung durch Gespräche, Rat und Tat haben diese Arbeit ermöglicht, zum Ziel geführt und zum Abschluss gebracht.

Für die gute Zusammenarbeit bei mikrobiologischen Untersuchungen in der Arbeitsgruppe für medizinische Mikrobiologie und die Übernahme des Zweitgutachtens danke ich Herrn Prof. Eugen Domann.

Herzlich danken möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der „Arbeitsgruppe Kunz“. Ich bin immer gern ins Institut gekommen und behalte die hier herrschende kollegial-freundschaftliche Atmosphäre, die auch meiner Arbeit sehr förderlich war, in bester Erinnerung.

Frau Prof. Dr. Silvia Rudloff, Frau Dr. Sabine Kuntz und Herrn Dr. Christian Borsch danke ich für anregend-herausfordernde, sehr hilfreiche Diskussionen und die große Unterstützung bei der Durchführung der Humanstudien. Frau Dr. Sabine Kuntz hat mich in guten und kritischeren Phasen meiner Promotionszeit in stets zuversichtlicher Art mit „offenem Ohr“ begleitet. Für diese unschätzbare Hilfe bin ich ihr ganz besonders dankbar. Herrn Borsch danke ich für ausgezeichnete methodenkritische Betreuung und Hilfe bei vielen analytischen Arbeiten im Labor.

Großer Dank geht auch an meine Mitdoktoranden Antje, Catrin, Christian, Heike, Ke, Marius, Tine und Viktoria. In vielen universitären und außeruniversitären Stunden haben wir kleine und große Probleme, ernste und fröhliche Ereignisse des Doktorandenalltags gemeinsam und anteilnehmend durchlebt.

Danken möchte ich den ANTHONIA-Projektpartnern für interessante und hilfreiche Diskussionen und Gespräche während der Projekttreffen.

Allen Probandinnen und Probanden, unseren „ANTHONIANERN“, danke ich für die zuverlässige und ausdauernde Teilnahme an den Humanstudien.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken. Sie alle haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Das größte Dankeschön gilt meiner lieben Lys vor allem dafür, dass sie die vielen mit dieser Arbeit verbundenen Stunden geduldig, verständnisvoll und aufmunternd mitgetragen hat.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungen	X
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Hintergrund	3
2.1 Anthocyane	3
2.1.1 Einordnung, Vorkommen und Chemie	3
2.1.2 Bioverfügbarkeit und Metabolisierung	6
2.2 Die intestinale Mikrobiota des Menschen	8
2.2.1 Entwicklung und Zusammensetzung	9
2.2.2 Funktionen und Stoffwechsel der intestinalen Mikrobiota und Interaktion mit dem Wirt	12
2.2.3 Anthocyane und die intestinale Mikrobiota	16
2.2.4 Untersuchung der intestinalen Mikrobiota und bakterieller Fermentations-eigenschaften im Colon	18
2.2.5 Lactose-[¹³ C]-Ureid und Lactose-[¹⁵ N, ¹⁵ N]-Ureid	21
3 Material und Methoden	29
3.1 Humanstudie I	29
3.1.1 Testgetränke	29
3.1.2 Lactose-[¹³ C]-Ureid und Lactose-[¹⁵ N ₂]-Ureid	30
3.1.3 Studienteilnehmer	30
3.1.4 Studiendesign	30
3.1.5 Messtage	31
3.1.6 Probenmanagement	32
3.1.6.1 Atemgasproben	32
3.1.6.2 Urinproben	32
3.1.6.3 Stuhlproben	33
3.2 Humanstudie II	33
3.2.1 Testgetränke und ¹³ C-LU und ¹⁵ N ₂ -LU	34
3.2.2 Studienteilnehmer	34
3.2.3 Studiendesign	34
3.2.4 Messtag	34
3.2.5 Probenmanagement	35

3.3 Analytik	35
3.3.1 Atemgasproben	35
3.3.2 Urinproben	37
3.3.2.1 C und N, ^{13}C und ^{15}N	37
3.3.2.2 p-Kresol	42
3.3.3 Stuhlproben	45
3.3.3.1 Trockensubstanz	45
3.3.3.2 pH-Wert	46
3.3.3.3 Kurzkettige Fettsäuren	46
3.3.3.4 Gesamtkeimzahl	50
3.4 Statistik	54
4 Ergebnisse	55
4.1 Humanstudie I	55
4.1.1 Auswertung und Darstellung der Daten der Humanstudie I	55
4.1.2 $^{13}\text{CO}_2$ in Atemgasproben	56
4.1.3 Urinproben	59
4.1.3.1 Renale C- und ^{13}C -Exkretion	59
4.1.3.2 Renale N- und ^{15}N -Exkretion	63
4.1.3.3 Renale p-Kresol-Exkretion	66
4.1.4 Stuhlproben	70
4.1.4.1 Trockenmasse und pH-Wert	70
4.1.4.2 Kurzkettige Fettsäuren	72
4.1.4.3 Gesamtkeimzahl	80
4.2 Humanstudie II	82
4.2.1 $^{13}\text{CO}_2$ in Atemgasproben	83
4.2.2 Renale ^{13}C -Exkretion	84
4.2.3 Renale ^{15}N -Exkretion	87
5 Diskussion	90
5.1 Studiendesign	91
5.1.1 Probandinnen	91
5.1.2 Testgetränke	92
5.1.3 Dauer der Washout- und Interventionsabschnitte	93
5.2 ^{13}C-LU und $^{15}\text{N}_2$-LU	94
5.2.1 $^{13}\text{CO}_2$ in Atemgasproben	95
5.2.2 Renale ^{13}C -Exkretion	97
5.2.3 Renale ^{15}N -Exkretion	99
5.3 Renale p-Kresol-Exkretion	106

5.4 Kurzkettige Fettsäuren und pH-Wert in Stuhlproben	108
5.5 Gesamtkeimzahl in Stuhlproben	112
5.6 Schlussfolgerungen	114
6 Zusammenfassung	116
7 Summary	119
Literaturverzeichnis	XII
Anhang	XXV

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1:	Unterteilung der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe in Stoffgruppen	3
Abb. 2-2:	Grundgerüst der Anthocyane und Substituenten der häufigsten Anthocyane in Lebensmitteln	5
Abb. 2-3:	Cyanidin-Verbindungen und deren Zerfallsprodukte	5
Abb. 2-4:	Schematische Darstellung der Absorption und des Metabolismus von Anthocyanen nach derzeitigem Kenntnisstand	7
Abb. 2-5:	Mikrobiota des Menschen an verschiedenen Bereichen des menschlichen Körpers	9
Abb. 2-6:	Altersabhängige Entwicklung der intestinalen Mikrobiota des Menschen	10
Abb. 2-7:	Bakterielle Besiedlungsdichte im Gastrointestinaltrakt	11
Abb. 2-8:	Funktionen kommensaler Mikroorganismen der intestinalen Mikrobiota des Menschen	13
Abb. 2-9:	Übersicht zum Transit aufgenommener Nahrung im Gastrointestinaltrakt und bakterieller Fermentation im Colon	14
Abb. 2-10:	Spaltung des C-Rings von Cyanidin durch Colonbakterien	17
Abb. 2-11:	Strukturformel von Lactose- ^{13}C -Ureid und Lactose- ^{15}N , ^{15}N -Ureid	21
Abb. 2-12:	Intestinale Metabolisierung von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU	22
Abb. 3-1:	Studiendesign der Humanstudie I, Interventionsstudie	32
Abb. 3-2:	Studiendesign der Humanstudie II	35
Abb. 3-3:	Schematische Darstellung eines Elementaranalysators gekoppelt an ein Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (EA-IRMS)	38
Abb. 3-4:	Eichgerade für C und N in Harnstoff am Elementaranalysator	41
Abb. 3-5:	Eichgerade für p-Kresol in Wasser am GC/MS	45
Abb. 3-6:	Ablaufschema FISH	50
Abb. 3-7:	Auswertungsbeispiel am Durchflusszytometer	54
Abb. 4-1:	$^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofile der Probandinnen aus Humanstudie I nach Aufnahme von ^{13}C -LU (500 mg) an den Messtagen vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) oder Placebo (PL)	56
Abb. 4-2:	$^{13}\text{CO}_2$ - Atemgaszeitprofile von 4 Probandinnen aus Humanstudie I nach Aufnahme von ^{13}C -LU (500 mg) an den Messtagen vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) oder Placebo (PL) in der Dimension „ $\delta^{13}\text{C}$ “	58

Abb. 4-3:	Veränderungen der renalen ^{13}C -Ausscheidungen (% Dosis) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen nach Aufnahme von ^{13}C -LU (500 mg) 0-6, 6-24 und 24-30 Stunden nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie, Saft und Placebo	60
Abb. 4-4:	Kumulative renale ^{13}C -Exkretion (% Dosis) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen 0-6 h nach Aufnahme von ^{13}C -LU (500 mg) vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) oder Placebo (PL)	61
Abb. 4-5:	Kumulative renale ^{13}C -Exkretion (% Dosis) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen 6-24 h nach Aufnahme von ^{13}C -LU (500 mg) vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL)	62
Abb. 4-6:	Veränderungen der renalen ^{15}N -Ausscheidungen (% Dosis) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen nach Aufnahme von $^{15}\text{N}_2$ -LU (75 mg) 0-6, 6-24 und 24-30 Stunden nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie, Saft und Placebo	64
Abb. 4-7:	Kumulative renale ^{15}N -Exkretion (% Dosis) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen 0-6 h nach Aufnahme von $^{15}\text{N}_2$ -LU (75 mg) vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL)	65
Abb. 4-8:	Kumulative renale ^{15}N -Exkretion (% Dosis) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen 6-24 h nach Aufnahme von $^{15}\text{N}_2$ -LU (75 mg) vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL)	66
Abb. 4-9:	Veränderungen der renalen p-Kresol-Ausscheidungen (mg) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen 0-6, 6-24 und 24-30 Stunden nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) oder Placebo (PL)	68
Abb. 4-10:	Kumulative renale p-Kresol-Exkretion (mg) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen 0-6 h vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) oder Placebo (PL)	69
Abb. 4-11:	Kumulative renale p-Kresol-Exkretion (mg) der Probandinnen an den Messtagen 6-24 h vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL)	70
Abb. 4-12:	pH-Wert in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL)	72

Abb. 4-13:	Veränderungen der Konzentrationen ($\mu\text{mol/g TM}$) von Acetat, Propionat und Butyrat in Stuhlproben der 30 Probandinnen aus Humanstudie I vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie, Saft und Placebo	73
Abb. 4-14:	Mittlere Anteile von Acetat, Propionat und Butyrat (%) an den Gesamtkonzentrationen (Summe aus Acetat, Propionat und Butyrat) kurzkettiger Fettsäuren in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie, Saft und Placebo	75
Abb. 4-15:	Acetatkonzentration ($\mu\text{mol/g TM}$) in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL)	76
Abb. 4-16:	Propionatkonzentrationen ($\mu\text{mol/g TM}$) in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL)	77
Abb. 4-17:	Butyratkonzentrationen ($\mu\text{mol/g TM}$) in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL)	78
Abb. 4-18:	Veränderungen der Konzentrationen ($\mu\text{mol/g TM}$) von Isobutytrat, Isovalerat und Valerat in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie, Saft und Placebo	79
Abb. 4-19:	Veränderungen der Gesamtkeimzahlen (KbE/g TM) in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie, Saft und Placebo	80
Abb. 4-20:	Gesamtkeimzahlen (KbE/ g TM) in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL)	81
Abb. 4-21:	$^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofile der Versuchspersonen aus Humanstudie II nach der Markerverabreichung (500 mg ^{13}C -LU) nüchtern und nach der Aufnahme von Smoothie (500 mg ^{13}C -LU + Smoothie 1 + Smoothie 2) bzw. Saft (500 mg ^{13}C -LU + Saft 1 + Saft 2) an den Messtagen in der Dimension „ $\delta^{13}\text{C}$ “	84
Abb. 4-22:	Kumulative renale ^{13}C -Ausscheidung (% Dosis) der Versuchspersonen aus Humanstudie II nach der Markerverabreichung (500 mg ^{13}C -LU) und der Aufnahme von Smoothie (500 mg ^{13}C -LU + Smoothie 1 + Smoothie 2) bzw. Saft (500 mg ^{13}C -LU + Saft 1 + Saft 2)	84

Abb. 4-23:	Kumulative renale ^{15}N -Ausscheidung (% Dosis) der Versuchspersonen aus Humanstudie II nach der Markerverabreichung (75 mg $^{15}\text{N}_2\text{-LU}$) nüchtern und nach der Aufnahme von Smoothie (75 mg $^{15}\text{N}_2\text{-LU}$ + Smoothie 1 + Smoothie 2) bzw. Saft (75 mg $^{15}\text{N}_2\text{-LU}$ + Saft 1 + Saft 2)	87
Abb. 5-1:	Subjektive Beurteilung der Bekömmlichkeit und des Geschmacks der Testgetränke durch Probandinnen der Humanstudie I	93
Abb. 5-2:	Stoffwechselweg des Lactoseureids	94
Abb. 5-3:	^{13}C -Urinzeitprofile (% Dosis) der Versuchspersonen aus Humanstudie II nach der Markerverabreichung (500 mg $^{13}\text{C-LU}$) und der Aufnahme von Smoothie (500 mg $^{13}\text{C-LU}$ + Smoothie 1 + Smoothie 2) bzw. Saft (500 mg $^{13}\text{C-LU}$ + Saft 1 + Saft 2)	99
Abb. 5-4:	^{15}N -Urinzeitprofile (% Dosis) der Versuchspersonen aus Humanstudie II nach der Markerverabreichung (75 mg $^{15}\text{N}_2\text{-LU}$) „nüchtern“	104
Abb. 5-5:	^{13}C - und ^{15}N -Ausscheidungsprofile im Urin (% Dosis) von 2 Versuchspersonen (2, 6) aus Humanstudie II nach der Markerverabreichung und der Aufnahme von Smoothie (500 mg $^{13}\text{C-LU}$ + 75 mg $^{15}\text{N}_2\text{-LU}$ + Smoothie 1 + Smoothie 2) bzw. Saft (500 mg $^{13}\text{C-LU}$ + 75 mg $^{15}\text{N}_2\text{-LU}$ + Saft 1 + Saft 2)	105
Abb. 5-6:	Gesamtkeimzahl in Stuhlproben (KbE/g TM) der Probandinnen aus Humanstudie I an den 6 Messtagen in chronologischer Reihenfolge und unabhängig der Testgetränkezufuhr	113

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1:	Anthocyangehalte ausgewählter Lebensmittel und Getränke	4
Tab. 2-2:	Verteilung wichtiger Vertreter der Mikrobiota des Menschen im Gastrointestinaltrakt	12
Tab. 2-3:	Ausgewählte Studien zur Metabolisierung und Anwendung von Lactose- $[^{13}\text{C}]$ -Ureid (^{13}C -LU) und Lactose- $[^{15}\text{N}, ^{15}\text{N}]$ -Ureid ($^{15}\text{N}_2$ -LU)	25
Tab. 3-1:	Analytische Kennzahlen der Testgetränke	29
Tab. 3-2:	Bedingungen der gaschromatographischen Trennung zur Bestimmung des $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ -Verhältnisses in Atemgasproben	36
Tab. 3-3:	Bedingungen der Elementaranalyse und gaschromatographischen Trennung zur Bestimmung des C- und N-Gehalts und der ^{13}C - und ^{15}N -Anreicherung in Urinproben	40
Tab. 3-4:	GC/MS-Bedingungen zur Bestimmung von p-Kresol in Urinproben	44
Tab. 3-5:	Gaschromatographische und massenspektrometrische Bedingungen zur Bestimmung von Acetat, Propionat und Butyrat in Stuhlproben	48
Tab. 3-6:	Gaschromatographische Bedingungen zur Bestimmung von Isobutyrat, Isovalerat und Valerat in Stuhlproben	49
Tab. 3-7:	Daten der verwendeten Oligonukleotidsonde	51
Tab. 4-1:	Zeitpunkt (h:min) der maximalen $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung (T_{\max}) im Atemgas der Probandinnen aus Humanstudie I nach Aufnahme von ^{13}C -LU an den Messtagen vor und nach der Intervention	56
Tab. 4-2:	Renale C- (mg) und ^{13}C -Exkretion (% Dosis) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen vor und nach den jeweils 14-tägigen Interventionen	59
Tab. 4-3:	Renale N- (mg) und ^{15}N -Exkretion (% Dosis) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen vor und nach den jeweils 14-tägigen Interventionen	63
Tab. 4-4:	Renale p-Kresol-Exkretion (mg) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen vor und nach den jeweils 14-tägigen Interventionen	67
Tab. 4-5:	Trockensubstanzgehalte (%) und pH-Werte von Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I vor und nach 14-tägiger Intervention mit den Testgetränken	71
Tab. 4-6:	Konzentrationen ($\mu\text{mol/g TM}$) von Acetat, Propionat und Butyrat in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL)	74

Tab. 4-7:	Konzentrationen ($\mu\text{mol/g TM}$) von Isobutyrat, Isovalerat und Valerat in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL)	79
Tab. 4-8:	Gesamtkeimzahlen ($\text{KbEx}10^7/\text{g TM}$) ¹ in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL)	80
Tab. 4-9:	Ergebnisübersicht zu Humanstudie II	82
Tab. 4-10:	Zeitpunkt der maximalen $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung (T_{max}) im Atemgas der Versuchspersonen aus Humanstudie II	83
Tab. 4-11:	Kumulative ^{13}C -Exkretion (%Dosis) in den einzelnen Urinfraktionen der Versuchspersonen aus Humanstudie II	86
Tab. 4-12:	Kumulative ^{15}N -Exkretion (% Dosis) in den einzelnen Urinfraktionen der Versuchspersonen aus Humanstudie II	88

Abkürzungen

^{13}C -LU	Lactose- ^{13}C -Ureid
$^{15}\text{N}_2$ -LU	Lactose- $^{15}\text{N}_2$ -Ureid
BMI	<i>body mass index</i> , Körpermasseindex
°C	Grad Celsius
C	Kohlenstoff
ca.	Circa
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
Cr ₂ O ₃	Chromoxid
Cu	Kupfer
EA	Elementaranalysator
FID	Flammenionisationsdetektor
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
g	Gramm/Erdbeschleunigung
GC/MS	Gaschromatographie gekoppelt an Massenspektrometrie
GU	Glucoseureid
h	Stunde(n)
h:min	Stunden:Minuten
IAEA	<i>International Atomic Energy Agency</i> , Wagramer Strasse 5, A-1400 Vienna, Austria
IRMS	<i>Isotope ratio mass spectrometer</i> , Isotopenverhältnis-Massenspektrometer
KbE	Koloniebildende Einheit
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kPa	Kilopascal
l	Liter
LPH	Lactase-Phloridzin-Hydrolase
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
Mg(ClO ₄) ₂	Magnesiumperchlorat
µl	Mikroliter
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar

MS	Massenspektrometer
MSD	<i>Mass selective detector</i> , Massenselektiver Detektor
MW	Mittelwert
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
rpm	<i>Rotation per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SGLT1	<i>Sodium dependent glucose transporter 1</i> , natriumabhängiger Glucose-Cotransporter 1
TCD	<i>Thermal conductivity detector</i> , Wärmeleitfähigkeitsdetektor
TM	Trockenmasse
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/mg	Units pro Milligramm
U/ml	Units pro Milliliter
Vol	Volumen
Vol. -%	Volumenprozent
vPDB	<i>Virtual Pee Dee Belemnite</i>
VT	Versuchstag
WoO	Wolframoxid

1 Einleitung und Zielsetzung

Die anerkannt günstigen ernährungsphysiologischen Wirkungen von Obst und Gemüse werden vor allem den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zugeschrieben. Zu dieser Gruppe gehören auch die polyphenolischen Anthocyane. Forschungsergebnisse aus *in vitro*-Untersuchungen und Tierstudien deuten auf protektive Wirkungen von Anthocyanen auf kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebserkrankungen und Diabetes hin und haben Überlegungen für ihren therapeutischen Einsatz eingeleitet.

Die Wirksamkeit beim Menschen lässt sich jedoch aufgrund unzureichender Kenntnisse über die Bioverfügbarkeit, Metabolisierung und Ausscheidung von Anthocyanen nur schwer beurteilen. Der Großteil oral aufgenommener Anthocyane gelangt in das Colon, wo sie der mikrobiellen Umsetzung unterliegen und dann in Form verschiedenster Metabolite in den systemischen Kreislauf gelangen.

Die intestinale Mikrobiota weist mit 10^{11} - 10^{12} Bakterienzellen je Gramm Darminhalt die höchste Besiedlungsdichte im Colon auf und setzt sich aus bis zu ca. 1000 verschiedenen Spezies zusammen. Zwischen den Bakterien und dem Wirtsorganismus bestehen enge Wechselwirkungen. Durch protektive, strukturelle und metabolische Funktionen kommt der intestinalen Mikrobiota und ihren Stoffwechselprodukten eine große Bedeutung für die Gesundheit des Menschen zu. Es gibt Hinweise auf mögliche präbiotische Effekte von Anthocyanen. Unter dem Einfluss von Anthocyanen kann aber auch die Zusammensetzung und Fermentationsaktivität der intestinalen Mikrobiota beeinflusst werden. Allerdings liegen hierzu kaum Humanstudien vor.

Die Untersuchung der intestinalen Mikrobiota beim Menschen stellt aufgrund der Unzugänglichkeit des Colons eine große Herausforderung dar. Zur Einschätzung der Zusammensetzung der Mikrobiota und mikrobieller Aktivitäten im menschlichen Colon dienen daher vorwiegend Untersuchungen von Fäzesproben sowie Simulationen von Fermentationsprozessen *in vitro*. Diese Untersuchungsmethoden erlauben nur eingeschränkte Aussagen zur intestinalen Mikrobiota im Colon, denn Fäzesproben stammen vornehmlich aus dem distalen Colon und nicht alle *in vivo*-Bedingungen können *in vitro* vollständig simuliert werden.

Eine neue Möglichkeit zur Untersuchung bakterieller Fermentationsprozesse im Colon bietet der Einsatz von Lactose- ^{13}C -Ureid (^{13}C -LU) und Lactose- ^{15}N , ^{15}N -Ureid ($^{15}\text{N}_2$ -LU). Diese Ureide werden durch menschliche Verdauungsenzyme nicht gespalten und gelangen nach oraler Aufnahme in das Colon, wo sie durch Mikroorganismen umgesetzt werden. Mit $^{15}\text{N}_2$ -LU kann der mikrobielle N-Umsatz und mit ^{13}C -LU die Fermentationsaktivität im Colon beurteilt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Anthocyanen auf die bakterielle Fermentation im Colon beim Menschen näher untersucht. Dazu dienten zwei Studien, in denen eine „langfristige“ (Humanstudie I) und eine „kurzfristige“ (Humanstudie II) Wirkung von Testgetränken mit unterschiedlichen Gehalten an Anthocyanen und Ballaststoffen auf mikrobielle Fermentationseigenschaften im Colon geprüft wurden. In beiden Studien wurden ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU oral gegeben und in zeitlich nach den Markergaben gestaffelten Sammelproben von Atemgas, Urin und Fäzes die folgenden Parameter gemessen:

- $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung
- ^{15}N -und p-Kresol-Ausscheidung im Urin
- pH-Wert, Konzentration kurzkettiger Fettsäuren und Gesamtkeimzahlen im Stuhl

Im Einzelnen lagen dieser Arbeit die folgenden Fragen zugrunde:

- Wie wirkt sich eine 14-tägige Zufuhr von Testgetränken mit unterschiedlichen Anthocyan- und Ballaststoffgehalten („langfristiger“ Effekt) auf bakterielle Fermentationseigenschaften im Colon aus?
- Wie wirkt sich eine einmalige Zufuhr („kurzfristiger“ Effekt) von anthocyanreichen Testgetränken mit unterschiedlichem Ballaststoffgehalt auf bakterielle Fermentationseigenschaften im Colon aus?
- Gibt es Zusammenhänge zwischen der $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung und der renalen ^{13}C - und ^{15}N -Ausscheidung?
- Gibt es Zusammenhänge zwischen renalen und fäkalen Parametern zur Beurteilung mikrobieller Fermentationseigenschaften im Colon?

2 Hintergrund

2.1 Anthocyane

Zahlreiche epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass eine Ernährung reich an Obst und Gemüse für den Menschen gesundheitsfördernd ist. Hierbei werden den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wichtige Wirkungen zugesprochen. Diese Stoffe entstehen im Sekundärstoffwechsel der Pflanze und sind nicht direkt, wie Substrate und Metabolite des Primärstoffwechsels, am Energieumsatz und Aufbau von Körperzellen beteiligt. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe werden in geringeren Mengen als Primärstoffe gebildet und dienen der Pflanze unter anderem als Schutz vor Krankheiten und Schädlingen sowie als Anlockstoffe und Wachstumsregulatoren [Watzl *et al.*, 2002, Crozier *et al.*, 2009, McGhie und Walton, 2007]. Anthocyane zählen zu den polyphenolischen Verbindungen der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe und stellen eine Untergruppe der Familie der Flavonoide dar (Abb. 2-1).

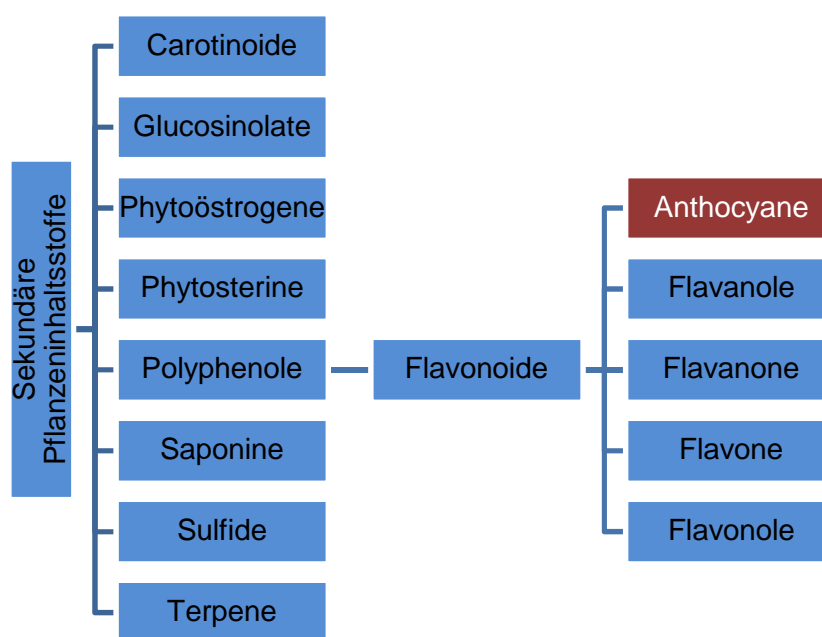


Abb. 2-1 Unterteilung der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe in Stoffgruppen

2.1.1 Einordnung, Vorkommen und Chemie

Der Name Anthocyane leitet sich aus dem Griechischen „anthos“ (Blüte) und „kyanos“ (blau) ab. Anthocyane bilden die größte Gruppe wasserlöslicher Pflanzenpigmente und sind verantwortlich für die rote, blaue und violette Farbgebung von Blütenblättern, Früchten und anderen Pflanzenorganellen [Clifford, 2000, Manach *et al.*, 2004]. Sie kommen insbesondere in Beeren und daraus hergestellten Säften und Weinen in relativ hohen Mengen vor [Clifford, 2000]. Tabelle 2-1 zeigt die in Studien ermittelten Anthocyangehalte ausgewählter Lebensmittel. Allerdings ist der Gehalt an Anthocyanen in Lebensmitteln abhängig von

verschiedenen Faktoren und Eigenschaften einschließlich Klima- und Witterungsbedingungen des Standortes, Verarbeitungsverfahren und Lagerung des Erntegutes. Auch die zu ihrer Quantifizierung anwendbaren Methoden können zu unterschiedlichen Gehalten führen, sodass es schwierig ist, allgemeingültige Aussagen zum Anthocyangehalt in Lebensmitteln zu treffen. Als Lebensmittelzusatzstoff E163 werden Anthocyane außerdem als natürlicher Lebensmittelfarbstoff eingesetzt [Clifford, 2000; Manach *et al.*, 2004].

Die durchschnittliche Anthocyanaufnahme kann im Bereich von 2,7-255 mg pro Person und Tag variieren. Dabei scheint sie stark regions- und jahreszeitenabhängig zu sein und von individuellen Ernährungsgewohnheiten beeinflusst zu werden. Wu *et al.* (2006) schätzten, basierend auf den Gehalten und Daten zur Nahrungsaufnahme des „National Health and Nutrition Examination Survey“ (NHANES) 2001-2002, die durchschnittliche, tägliche Anthocyanaufnahme in den USA auf 12,5 mg pro Person. In Deutschland wird die tägliche Aufnahme auf 2,7 mg mit einem Variationsbereich von 0-76 mg pro Person und Tag geschätzt. Allein eine Portion Beeren kann bereits mehrere hundert Milligramm Anthocyane enthalten und schon mit einem Glas Rotwein werden 24-35 mg Anthocyane aufgenommen [He und Giusti, 2010; McGhie und Walton 2007; Watzl *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2006].

Tab. 2-1 Anthocyangehalte ausgewählter Lebensmittel und Getränke [Clifford, 2000]

Lebensmittel	Anthocyangehalt (mg/l oder mg/kg)
Brombeere	1150
Heidelbeere	825-4200
Schwarze Johannisbeere	1300-4000
Kirschen	20-4500
Rote Trauben	300-7500
Rotwein	240-350
Blutorangensaft	2000
Zwiebel	Bis 250

Der Begriff Anthocyane umfasst einerseits die Anthocyanidine, die Aglykone und andererseits die Anthocyanine, die Glykoside und damit insgesamt über 500 chemisch unterschiedliche Verbindungen. Das C6-C3-C6-Grundgerüst der Anthocyane besteht aus zwei Benzolringen (A- und B-Ring), welche durch einen heterozyklischen (C-) Ring miteinander verbunden sind (Abb. 2-2). In der Natur liegen Anthocyane meist in glykosilierter Form vor, wobei der Zuckerrest am häufigsten am C3-Atom gebunden ist. Die Vielzahl der unterschiedlichen Anthocyanverbindungen ergibt sich aus Anzahl, Art und Position der Hydroxyl- und Methoxylsubstituenten und Zuckerreste [Clifford, 2000; Crozier *et al.*, 2009; McGhie und Walton, 2007].

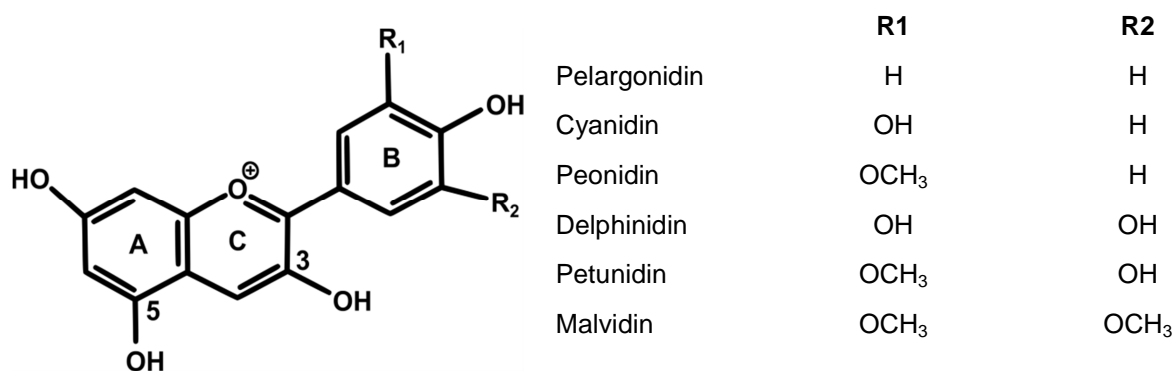


Abb. 2-2 Grundgerüst der Anthocyane und Substituenten der häufigsten Anthocyane in Lebensmitteln
[modifiziert nach Aura *et al.*, 2005]

Anthocyane sind sehr instabile Verbindungen, die durch Sauerstoff, Temperatur- und pH-Wertänderungen, Licht und verschiedene Enzyme schnell in ein Aldehyd und eine phenolische Carbonsäure zerfallen (Abb. 2-3). Dabei sind Anthocyanine deutlich stabiler als Anthocyanidine [Fleschhut 2004; Kay *et al.*, 2009]. Die Bedingungen bei der Passage durch den Gastrointestinaltrakt begünstigen einen Zerfall von Anthocyanen. Dies muss bei einer gesundheitlichen Bewertung und der Bioverfügbarkeit von Anthocyanen berücksichtigt werden [Crozier *et al.*, 2009; McGhie und Walton 2007; He und Giusti 2010].

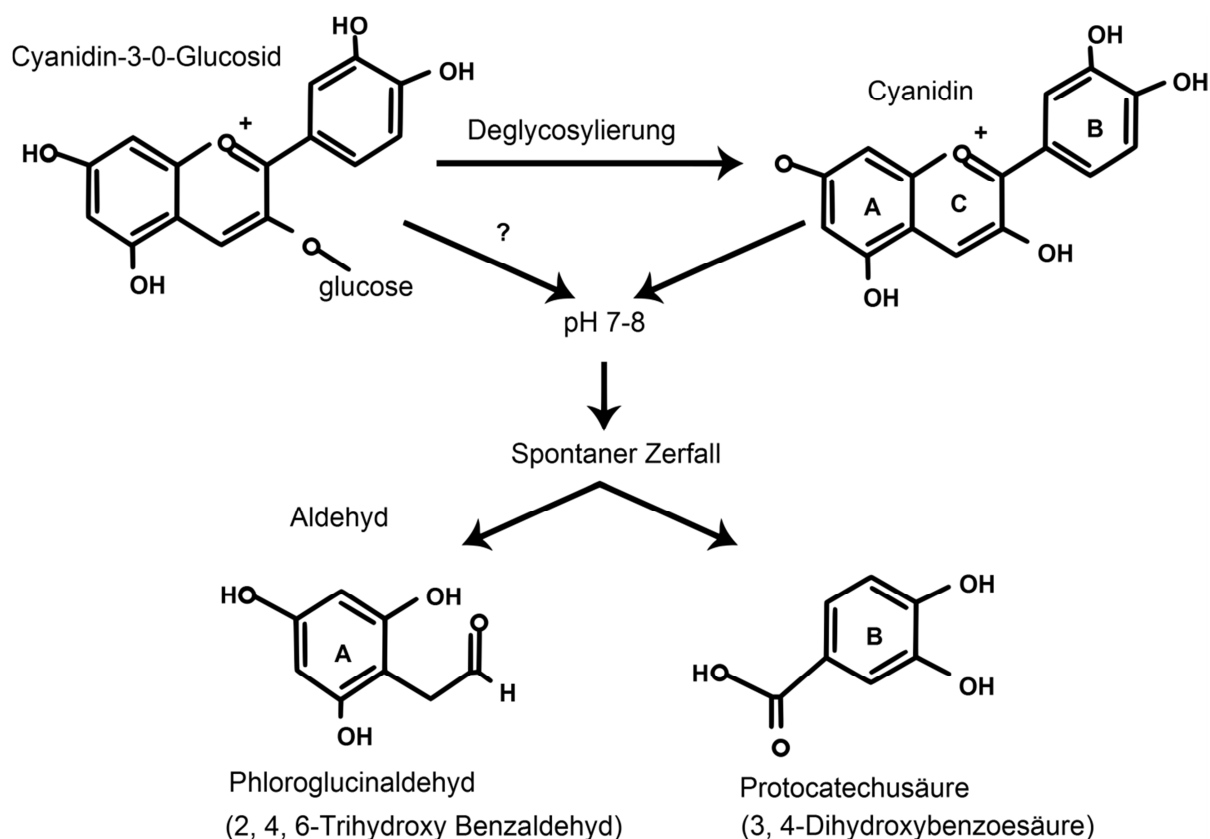


Abb. 2-3 Cyanidin-Verbindungen und deren Zerfallsprodukte [modifiziert nach Kay *et al.*, 2009]

2.1.2 Bioverfügbarkeit und Metabolisierung

Die Bioverfügbarkeit intakter Anthocyane wird als sehr gering eingeschätzt und die Metabolisierung nutritiv zugeführter Anthocyane ist noch nicht vollständig aufgeklärt. In Tierstudien zur Bioverfügbarkeit von Anthocyanen wurden die höchsten Plasmakonzentrationen intakter Anthocyane 0,25-2 Stunden nach Aufnahme der Anthocyane gemessen und die renale Ausscheidung scheint mit $< 0,2$ % der verabreichten Dosis sehr gering [Matsumoto *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2003; Ichiyonagi *et al.*, 2004; Ichiyonagi *et al.*, 2005; Talavera *et al.*, 2005]. Neben den ursprünglich meist als Glykoside verabreichten Anthocyanen konnten sowohl im Plasma wie auch im Urin methylierte und glucuronidierte Metabolite von Anthocyanen nachgewiesen werden [Felgines *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005]. In Humanstudien wurden mit < 1 % nur sehr geringe Mengen der aufgenommenen Anthocyane im Plasma und Urin wiedergefunden. Dabei traten auch hier Metabolite und Abbauprodukte von Anthocyanen auf [Bub *et al.*, 2001; Garcia-Alonso *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2011; Matsumoto *et al.*, 2001].

Diese Ergebnisse deuten auf eine schnelle Absorption und intensive, intestinale und mikrobielle Metabolisierung von Anthocyanen hin und lassen vermuten, dass möglicherweise nicht nur die Anthocyane selbst, sondern deren Metabolite und Abbauprodukte für physiologische Wirkungen beim Menschen verantwortlich sein könnten [Kay *et al.*, 2004; Kay *et al.*, 2009; Prior und Wu, 2006].

Hierzu zählen gesundheitsfördernde Eigenschaften wie kardio- und gastroprotektive, antikanzerogene und antiinflammatorische Wirkungen wie auch Schutz vor Diabetes und Adipositas [He und Giusti, 2010; Prior und Wu, 2006; Wang und Stoner, 2008]. Allerdings wurden in vielen Untersuchungen unphysiologisch hohe Konzentrationen einzelner Anthocyane eingesetzt. Anthocanwirkungen unter normalen Ernährungsbedingungen des Menschen sind bisher unzureichend belegt und deshalb nur schwer zu bewerten [Clifford, 2004].

Anthocyane unterliegen nach oraler Aufnahme umfangreichen Metabolisierungs-, Konjugierungs- und Abbauprozessen im menschlichen Gastrointestinaltrakt. Die genauen Mechanismen sind noch nicht hinreichend aufgeklärt. Abbildung 2-4 zeigt die Absorption und Metabolisierung von Anthocyanen nach derzeitigem Kenntnisstand.

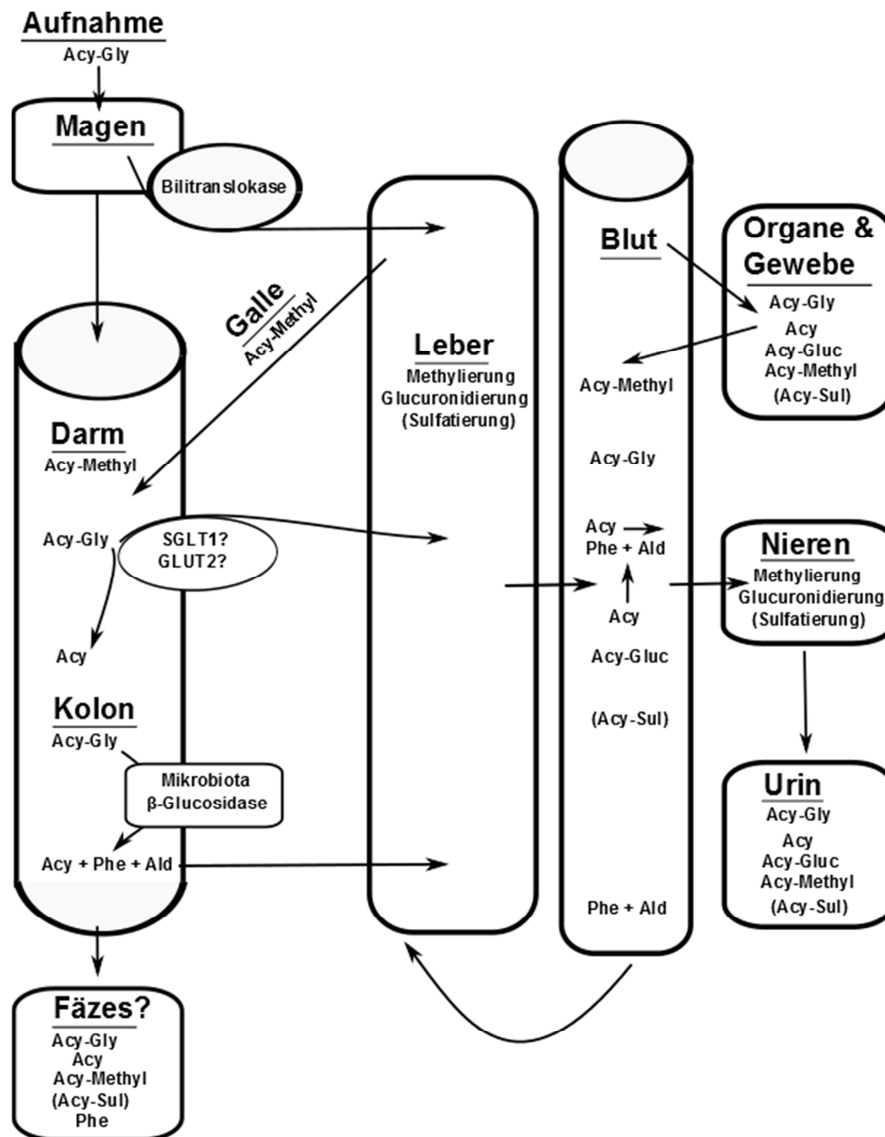


Abb. 2-4 Schematische Darstellung der Absorption und des Metabolismus von Anthocyanen nach derzeitigem Kenntnisstand (modifiziert nach McGhie und Walton, 2007) (Acy-Gly = Anthocyananglykoside, Acy = Anthocyan Aglykone, Acy-methyl = methylierte Metabolite, Acy-Gluc = glucuronidierte Metabolite, SGLT1 = sodium dependent glucose transporter (Natrium-abhängiger Glucose-Cotransporter), LPH = Lactase-Phloridzin-Hydrolase)

Aglykonische Anthocyanverbindungen sind aufgrund ihres hydrophoben Charakters in der Lage, biologische Membranen durch passive Diffusion zu passieren und so in die Darmzellen aufgenommen zu werden. Anthocyananglykoside hingegen besitzen eine höhere Wasserlöslichkeit, wodurch eine passive Diffusion durch Membranen erschwert ist und es naheliegt, dass sie entweder über einen aktiven Transport oder nach Hydrolyse des β-Glykosids absorbiert werden [Kay, 2006]. Untersuchungen weisen darauf hin, dass Anthocyane bereits im Magen unter Beteiligung des in der Magenmukosa lokalisierten Membrancarriers Bilitranslocase absorbiert werden können [Passamonti *et al.*, 2002; Passamonti *et al.*, 2003; Talavera *et al.*, 2003]. Nach Durchlaufen der Leber könnte dann ein Teil der hier gebildeten methylierten, glucuronidierten oder sulfatierten Anthocyanmetabolite

in den systemischen Kreislauf und ein Teil über den enterohepatischen Kreislauf von der Leber mit der Galle in den Dünndarm gelangen. Anthocyanglykoside, die nicht im Magen absorbiert wurden, könnten im Dünndarm über den natriumabhängigen Glucosetransporter (SGLT1) von Enterocyten aufgenommen und durch im Cytosol lokalisierte β -Glucosidasen hydrolysiert werden [Kay, 2006]. Allerdings werden nach einer *in vitro* Studie von Kottra und Daniel (2007) keine Flavonoidglykoside über den SGLT1-Transporter transportiert. Möglich wäre nach Faria *et al.* (2009) auch eine Aufnahme über den Glucosetransporter GLUT2. Des Weiteren ist es möglich, dass Anthocyanglykoside im Dünndarm durch das im Bürstensaum der Enterocyten lokalisierte Enzym Lactase-Phloridzin-Hydrolase (LPH) hydrolysiert und die entstandenen Aglykone über passive Diffusion aufgenommen werden [Day *et al.*, 2000]. Anthocyane und Anthocyanmetabolite, die in den systemischen Kreislauf gelangen, werden vermutlich über den Urin, die Galle und die Fäzes wieder ausgeschieden [Kay 2006]. Neben Anthocyanen, die nicht im Magen oder Dünndarm absorbiert wurden, können absorbierte Anthocyane über die Galle in das Colon gelangen. Hier stehen sie einer Vielzahl von Mikroorganismen gegenüber, durch die sie vermutlich intensiv metabolisiert werden [Manach *et al.*, 2004; McGhie *et al.*, 2009].

Auf die Wechselwirkungen zwischen der intestinalen Mikrobiota und Anthocyanen wird in späteren Abschnitten (Kapitel 2.2.3) näher eingegangen.

2.2 Die intestinale Mikrobiota des Menschen

Der menschliche Organismus ist von einer Vielzahl kommensaler Mikroorganismen besiedelt, mit denen er größtenteils in Symbiose zusammenlebt. Die Gesamtheit aller Mikroorganismen wird als Mikrobiota bezeichnet. Diese findet sich nahezu an jeder Kontaktfläche des Menschen zur Außenwelt wieder und übersteigt mit einer Gesamtzellzahl von ca. 10^{14} die körpereigenen Zellen um das Zehnfache. Je nach bestehenden Milieubedingungen dominieren unterschiedliche Bakterienarten in den verschiedenen Bereichen des menschlichen Körpers (Abb. 2-5) [Wilson, 2005]. Der Darm stellt mit seiner Oberfläche von ca. 400 m^2 die größte Grenzfläche des Menschen zur Außenwelt dar und ist das am dichtesten von Mikroorganismen besiedelte Organ des Menschen [Chow *et al.*, 2010; Wilson 2005]. Mit 10^{11} - 10^{12} Zellen je Gramm Darminhalt und einer Biomasse von $> 1 \text{ kg}$ sind allein im Colon über 70 % aller Mikroorganismen des menschlichen Körpers angesiedelt [Chow *et al.*, 2010; Ley *et al.*, 2006; O'Hara und Shanahan, 2006; Sekirov *et al.*, 2010]. Es wird angenommen, dass hier ca. 1000 verschiedene Bakterienspezies vorkommen, wobei der Großteil der Zellmasse aus 30-40 dominanten Spezies gebildet wird [Claesson *et al.*, 2009; Quin *et al.*, 2010]. Innerhalb des humanen Mikrobiomprojektes, einer Initiative des US-amerikanischen National Institutes of Health, wird die Rolle der Mikroorganismen auf die menschliche Gesundheit untersucht. Dazu soll die

Zusammensetzung und das metabolische Potenzial mikrobieller Gemeinschaften auf Mukosaoberflächen des menschlichen Körpers analysiert und charakterisiert werden [HMP, 2014; NIH, 2014].

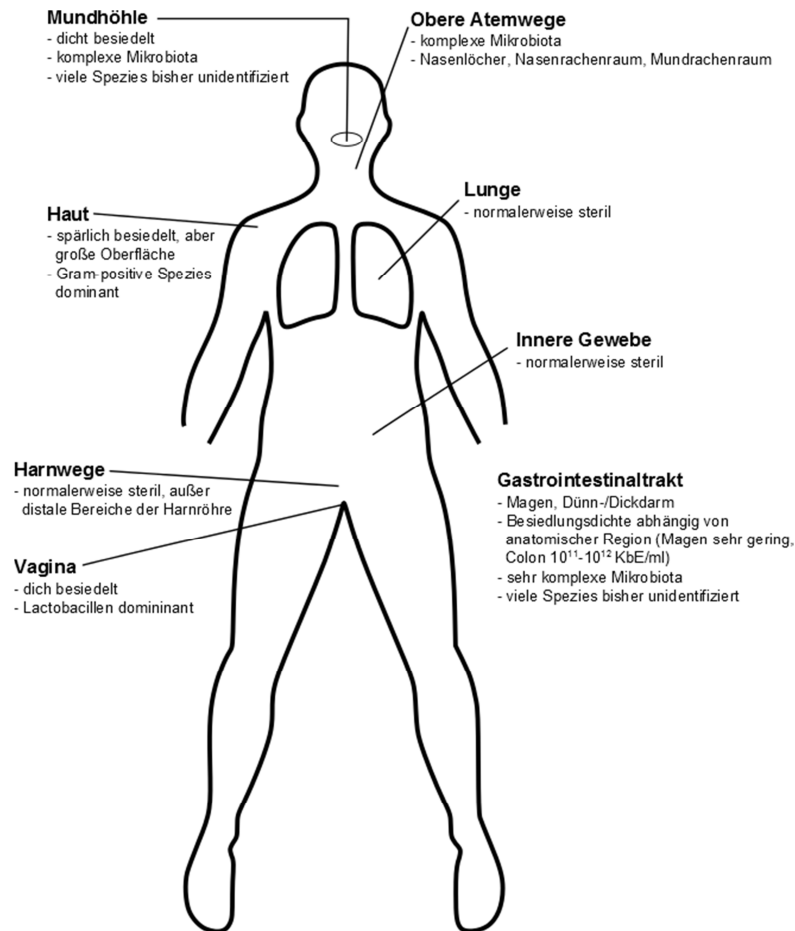


Abb. 2-5 Mikrobiota des Menschen an verschiedenen Bereichen des menschlichen Körpers [modifiziert nach Wilson, 2005]

2.2.1 Entwicklung und Zusammensetzung

Der Gastrointestinaltrakt (GIT) des Fötus ist steril. Eine Besiedlung mit Mikroorganismen der Mutter und der Umgebung beginnt schon während des Geburtsprozesses [Macfarlane und Macfarlane 2009; Sekirov *et al.*, 2010]. Die Zusammensetzung und Entwicklung der Mikrobiota eines Säuglings wird dabei durch verschiedene Faktoren wie Art der Geburt, Mikrobiota der Mutter und der Umgebung sowie Art der Nahrung und möglicherweise Medikamente beeinflusst [Fallani *et al.*, 2010; Mandar und Mikelsaar 1996; Matamoros *et al.*, 2013]. In Stuhlproben einen Monat alter Säuglinge nach vaginaler Entbindung konnten höhere Gesamtzahlen an Mikroorganismen und Bifidobakterien nachgewiesen werden als nach Entbindung durch einen Kaiserschnitt [Azad *et al.*, 2013; Fallani *et al.*, 2011; Huurre *et al.*, 2008].

Zu den Erstbesiedlern des Darmes zählen Enterobakterien wie *E. coli*, Laktobazillen, wie z.B. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius* sowie Staphylokokken und Enterokokken. Als fakultative Anaerobier verbrauchen insbesondere Enterobakterien den

vorhandenen Sauerstoff, sodass das intestinale Redoxpotential Neugeborener innerhalb der ersten zwei Tage von 178 mV auf -113 mV sinkt [Tannock 1995]. Diese Bedingungen erlauben das Wachstum und die Vermehrung strikt anaerober Bakterien. Dabei weisen gestillte Säuglinge eine Dominanz an Bifidobakterien, besonders an *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve* und *Bifidobacterium longum* auf. Bei nicht gestillten Säuglingen scheint die Mikrobiota komplexer zusammengesetzt zu sein, und neben Bifidobakterien kommen Bacteroiden, Clostridien, Staphylokokken und Laktobazillen in höheren Konzentrationen vor [Fallani *et al.*, 2010; Harmsen *et al.*, 2000; Sakata *et al.*, 2005]. Mit dem Abstillen, Einführung der Beikost und der sukzessiven Änderung der Ernährung hin zur dauerhaften Festnahrung entwickelt und stabilisiert sich eine diverse Mikrobiota. Nach ca. einem Jahr ähnelt sie der von Erwachsenen (Abb. 2-6) [Favier *et al.*, 2002; Palmer *et al.*, 2007; Sekirov *et al.*, 2010].

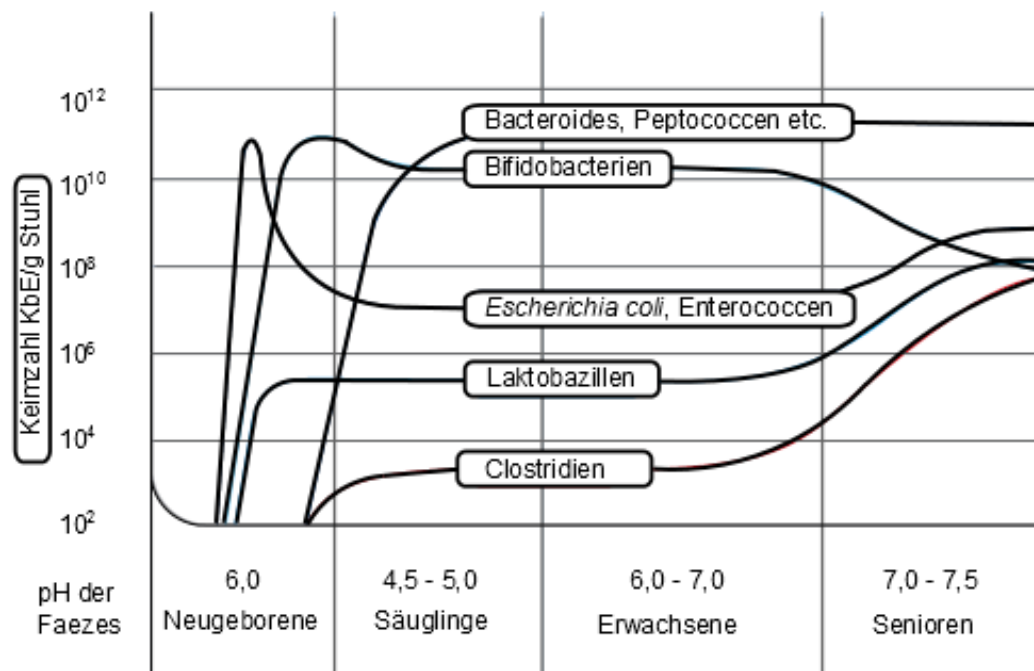


Abb. 2-6 Altersabhängige Entwicklung der intestinalen Mikrobiota des Menschen [modifiziert nach Yakult nach Mitsuoka, 1992]

Die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota des Menschen scheint sehr individuell zu sein, wobei es Hinweise auf „Kerngemeinschaften“ von Mikroorganismen bei allen Menschen gibt. Studien deuten darauf hin, dass der Großteil der intestinalen Mikroorganismen mit bis zu 80 % zum Stamm der Firmicutes zählt, gefolgt von ca. 10 % Bacteroidetes und 1,5 % Actinobacteria [Eckburg *et al.*, 2005; Tuovinen *et al.*, 2011]. Interindividuelle Unterschiede bestehen hauptsächlich in den Anteilen einzelner Bakterienspezies innerhalb der dominanten Bakterienstämme [Eckburg *et al.*, 2005; Ley *et al.*, 2006; Turnbaugh *et al.*, 2009]. Trotz verschiedener Einflussfaktoren wie Genetik, Umwelt- und Lebensbedingungen, Gesundheitszustand, Ernährung und Medikamente ist die individuelle Zusammensetzung der

intestinalen Mikrobiota über die Zeit weitgehend stabil [Hopkins *et al.*, 2001; Ley *et al.*, 2005; Sekirov *et al.*, 2010]. Trotz der großen interindividuellen Unterschiede der intestinalen Mikrobiota, konnten Arumugam *et al.* (2011) drei verschiedene Enterotypen identifizieren, die sich hinsichtlich der im Darm dominierenden Bakterien unterscheiden. Demnach lässt sich zwischen *Bacteroides* (Enterotyp 1), *Prevotella* (Enterotyp 2) und *Ruminococcus* (Enterotyp 3) differenzieren.

Die Anzahl und Diversität der Mikroorganismen nehmen entlang des Gastrointestinaltraktes von Magen bis Colon zu. Aufgrund der sauren Bedingungen, bei einem pH-Wert von 2-3 im Magen, ist hier nur wenigen Bakterien wie z.B. Laktobazillen und Streptokokken ein Leben möglich [Bik *et al.*, 2006]. Im Dünndarm nimmt die bakterielle Besiedlungsdichte stetig zu und sie erreicht das Maximum im Colon mit 10^{11} - 10^{12} Zellen je Gramm Darminhalt. In tieferen Darmabschnitten liegen komplexere Bakteriengemeinschaften u.a. mit Vertretern der Gattung *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.* und *Bacteroides spp.* vor [O'Hara, Shanahan, 2006]. Abbildung 2-7 und Tabelle 2-2 zeigen bedeutende Vertreter der Mikrobiota und deren Verteilung im Gastrointestinaltrakt.

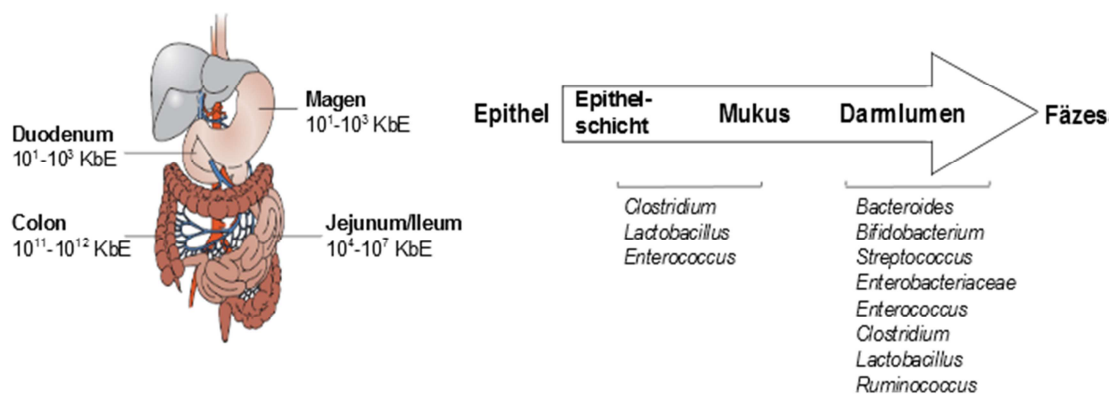


Abb. 2-7 Bakterielle Besiedelungsdichte im Gastrointestinaltrakt (KbE = Koloniebildende Einheit)
[modifiziert nach O'Hara und Shanahan 2006; Sekirov *et al.*, 2010]

Tab. 2-2 Verteilung wichtiger Vertreter der Mikrobiota des Menschen im Gastrointestinaltrakt (GIT) [Bik *et al.*, 2006; Eckburg *et al.*, 2005]

GIT-Abschnitt	Wichtige Vertreter der Mikrobiota
Magen	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>
Dünndarm	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i>
Dickdarm	<i>Bacteroides</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>

Neben Unterschieden entlang des GIT wurden auch Unterschiede zwischen einer Mukosa-assoziierten, luminalen und fäkalen Mikrobiota beschrieben. So konnten z.B. im Mukus und in Krypten des Epithels nur Clostridien, Laktobazillen und Enterokokken nachgewiesen werden, während in Fäzes zusätzlich Bifidobakterien, Bacteroiden und Streptokokken auftraten [Eckburg *et al.*, 2005; Sekirov *et al.*, 2010; Swidsinski *et al.*, 2005]. Somit bestehen inter- wie auch intraindividuelle Variationen in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota.

Im Alter (> 65 Jahre) kommt es durch veränderte Geschmacks- und Geruchsempfindungen, verminderte Säureproduktion im Magen und verlängerte intestinale Transitzeit zu Veränderungen im Verdauungstrakt und damit einhergehend zu einer Beeinflussung der Mikrobiota. Trotz sehr starker interindividueller Unterschiede in der Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota älterer Menschen beschreiben Claesson *et al.* (2011) eine Bacteroidetes-Dominanz im Gegensatz zu einer Firmicutes-Dominanz in Stuhlproben junger Erwachsener. Während die Zellzahl der Bacteroiden und Bifidobakterien sinkt und auch die Diversität in diesen Gruppen abnimmt, steigt die Zahl der Eubakterien, Clostridien und Fusobakterien, sodass die Gesamtzellzahl insgesamt stabil bleibt [Woodmannsey 2007].

2.2.2 Funktionen und Stoffwechsel der intestinalen Mikrobiota und Interaktion mit dem Wirt

Die intestinale Mikrobiota kann als eigenes „Organ“ im menschlichen Wirtsorganismus angesehen werden. Zwischen Mikroorganismen und Wirt bestehen enge Wechselwirkungen, die durch Symbiose, Kommensalismus und z.T. auch Parasitismus und Pathogenität gekennzeichnet sind. Der Darm des Menschen stellt ein geschütztes anoxisches Habitat für

Mikroorganismen dar, das die genetischen und metabolischen Eigenschaften und Möglichkeiten des Wirtes erweitert [Bäckhed *et al.*, 2005; Bischoff *et al.*, 2009; O'Hara und Shanahan, 2006]. Durch die Erfüllung wichtiger protektiver, struktureller und metabolischer Funktionen am Darmepithel spielt die intestinale Mikrobiota eine bedeutende Rolle für die Gesundheit des Darms und des gesamten Organismus des Menschen. Abbildung 2-8 zeigt wichtige Funktionen kommensaler Colonbakterien wie *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*.

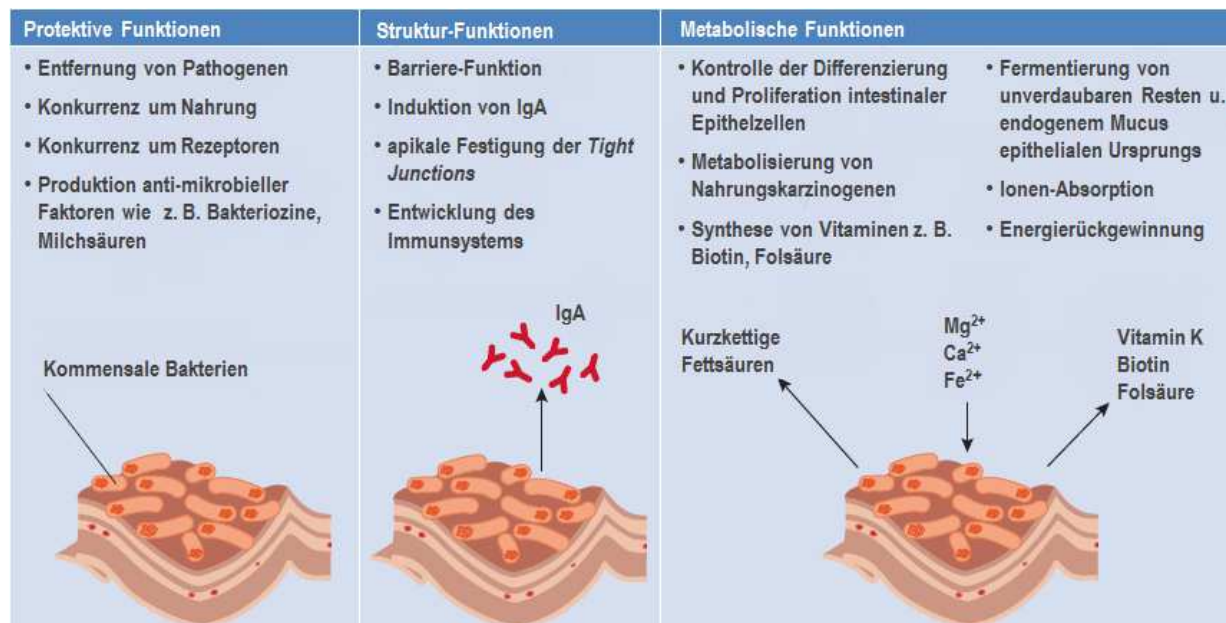


Abb. 2-8 Funktionen kommensaler Mikroorganismen der intestinalen Mikrobiota des Menschen (IgA = Immunglobulin A) [modifiziert nach O'Hara und Shanahan 2006]

Kommensale Bakterien stellen u.a. eine physikalische Barriere im Darm dar und fördern die Entwicklung und Ausbildung sowohl des Darm- wie auch des systemischen Immunsystems, wodurch ein Eindringen aufgenommener Antigene und Pathogene in den systemischen Kreislauf vermieden werden kann [O'Hara und Shanahan 2006].

Zu den metabolischen Funktionen der intestinalen Mikrobiota zählt u.a. die Fermentierung unverdauter und/oder unvollständig verdauter und resorbierter Nahrungsbestandteile. Bevorzugtes Substrat für die Darmbakterien im Colon sind dabei für den Menschen unverdauliche Kohlenhydrate wie z.B. Cellulose, resistente Stärke oder Inulin. *Bacteroides spp.*, *Ruminococcus spp.* scheinen besonders beteiligt zu sein, wobei Inulin bzw. Fructoseoligomere insbesondere von Bifidobakterien verstoffwechselt werden [Bischoff *et al.*, 2009; Scott *et al.*, 2013]. Die Menge an unverdauten Kohlenhydraten, die über die Nahrung täglich das Colon erreichen, wird auf ca. 40 g geschätzt, gefolgt von Proteinen mit 12-18 g am Tag. Neben unverdauten Nahrungsbestandteilen stellen abgeschilferte Darmepithelzellen, Mukopolysaccharide des Darmschleims und Verdauungssekrete wichtige endogene Stickstoff-Substrate für die Darmbakterien dar [Scott *et al.*, 2013; Tremalori,

Bäckhed 2012; Saulnier *et al.*, 2009]. Zu den dominierenden proteolytischen Bakterien im menschlichen Colon zählen u.a. *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.* und *Propionibacterium spp.* [Bischoff *et al.*, 2009; Scott *et al.*, 2013].

Kohlenhydrate als bevorzugtes Substrat für intestinale Mikroorganismen führen insbesondere im proximalen Colon zu intensiver bakterieller saccharolytischer Fermentation [Hamer *et al.*, 2012; Topping und Clifton, 2001]. Entlang des Colons sinkt von proximal nach distal die Konzentration fermentierbarer Kohlenhydrate, während zunehmend Proteine den Darmbakterien als Fermentationssubstrat dienen. Kohlenhydrate werden hauptsächlich zu den kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat sowie zu den Gasen H_2 , CO_2 und CH_4 fermentiert und Stickstoffverbindungen können dabei von den Darmbakterien zum Zellaufbau genutzt werden. Bei der bakteriellen Fermentation von Proteinen und Stickstoffverbindungen entstehen außerdem verzweigtkettige Fettsäuren, Phenole, Indole, Amine und NH_3 (Abb. 2-9) [Hamer *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2013; Topping und Clifton, 2001].

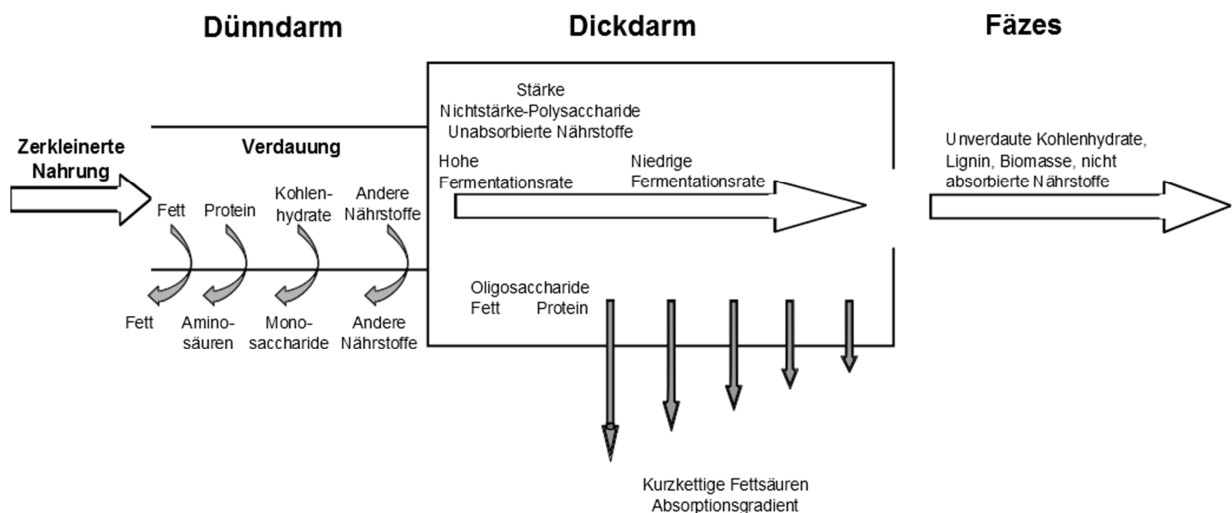


Abb. 2-9 Übersicht zum Transit aufgenommener Nahrung im Gastrointestinaltrakt und bakterieller Fermentation im Colon [modifiziert nach Topping und Clifton, 2001]

Die bakterielle Fermentation von Kohlenhydraten im Colon wirkt i.d.R. gesundheitsfördernd für den Wirt, weil die gebildeten Metabolite, insbesondere die kurzkettigen Fettsäuren, vom Wirt genutzt werden können. Während Acetat in peripheren Geweben zur Energiegewinnung und Propionat in der Leber zur Gluconeogenese dient, werden bis zu 70 % des Energiebedarfs der Darmepithelzellen durch Butyrat gedeckt [Bischoff *et al.*, 2009; Hamer *et al.*, 2012]. Für Butyrat werden in der Literatur außer seiner Funktion als Energielieferant antiinflammatorische, antioxidative und antikanzerogene Wirkungen und seine Bedeutung als Signalmolekül für Epithelzellproliferation und -differenzierung diskutiert. Butyrat spielt damit eine wichtige Rolle für die Darmgesundheit und Aufrechterhaltung des Darmmilieus [De Graaf und Venema 2008; Leonel und Alvarez-Leitel, 2012]. Eine hohe Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren im Darmlumen führt zu einer Senkung des pH-Wertes. Dadurch

können das Wachstum und die Ansiedelung potentiell pathogener Bakterien vermindert und gleichzeitig die Mineralabsorption verbessert werden [Bischoff *et al.*, 2009; Hamer *et al.*, 2012].

Eine bakterielle Proteinfermentation im Colon ist aufgrund der Bildung potentiell toxischer Metabolite wie Phenolen, schwefelhaltigen Verbindungen, Aminen und NH_3 eher unerwünscht oder sogar „schädlich“ für den Menschen. Diese Fermentationsprodukte werden in Verbindung mit der Entstehung von Colonkrebs und entzündlichen Veränderungen/Erkrankungen im Colon diskutiert. So konnten beim Menschen besonders im distalen Colon, dem Hauptort der Entstehung von Colonkrebs und entzündlichen Darmerkrankungen, hohe Konzentrationen der proteolytischen und toxischen Fermentationsprodukte nachgewiesen werden [Hamer *et al.*, 2012; Hughes *et al.*, 2000; Windey *et al.*, 2012]. Durch die sinkende Kohlenhydrat- und die ansteigende Proteinfermentation vom proximalen zum distalen Colon sinkt die Bildung kurzkettiger Fettsäuren. Hierdurch kommt es zu einem Anstieg des pH-Wertes von leicht sauer bis neutral bis zu leicht basisch im distalen Colon [Windey *et al.*, 2012]. Das Ausmaß der Kohlenhydrat- und Proteinfermentation im Colon kann maßgeblich über die Ernährung beeinflusst werden. Je höher die Aufnahme unverdaulicher Kohlenhydrate mit der Nahrung ist, desto größere Substratmengen stehen den Darmbakterien für die saccharolytische Fermentation zur Verfügung. In ähnlicher Weise steigt die bakterielle Proteinfermentation im Colon, wenn sich die Menge an unverdaulichem Nahrungsprotein im Colon erhöht [Hamer *et al.*, 2012; Windey *et al.*, 2012]. Als Beispiel für eine Ernährungsintervention kann der Einsatz von Präbiotika wie Inulin und Oligofructose dienen. Diese Substrate sollen die saccharolytische Fermentation der Darmbakterien im Colon fördern und verlängern und damit gleichzeitig proteolytische Fermentationsaktivitäten und die Bildung toxischer Metabolite vermindern [Hamer *et al.*, 2012].

Enge Wechselwirkungen zwischen der intestinalen Mikrobiota und dem Wirt bestehen auch bei der bakteriellen Umsetzung von Gallensäuren im Colon. Im enterohepatischen Kreislauf umgesetzte Gallensäuren werden nach Sezernierung im Duodenum bis zum Ileum größtenteils wieder rückresorbiert. Etwa 5 % der Gallensäuren gelangen in das Colon, wo sie Mikroorganismen als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelquelle dienen. Bei der bakteriellen Umsetzung können die sekundären Gallensäuren Desoxycholsäure und Lithocholsäure entstehen, die als krebserregend und als Tumorpromotoren bei Dickdarmkrebs gelten [De Preter *et al.*, 2011; Pearson *et al.*, 2009].

Auch polyphenolische Verbindungen der Nahrung, darunter Anthocyane, scheinen intensiv durch Mikroorganismen im Colon des Menschen metabolisiert zu werden [Manach *et al.*, 2004; McGhie und Walton, 2007]. Im Folgenden soll die mikrobielle Metabolisierung von

Anthocyanen und deren Wechselwirkungen mit der intestinalen Mikrobiota näher betrachtet werden.

2.2.3 Anthocyane und die intestinale Mikrobiota

In welchem Ausmaß Anthocyane in das menschliche Colon gelangen und hier durch Mikroorganismen metabolisiert werden, ist derzeit ungeklärt. Nach einer Studie an Ileostoma-Patienten konnten nach oraler Aufnahme von Blaubeeren und Himbeeren – abhängig vom Zuckerrest - bis zu 85 % bzw. 40 % der aufgenommenen Anthocyane in der ilealen Flüssigkeit wiedergefunden werden [Gonzales-Barrio *et al.*, 2010; Kahle *et al.*, 2006]. Beim gesunden Menschen würden diese Mengen in das Colon gelangen. Hier treffen die Anthocyane auf die hohen katalytischen und hydrolytischen Aktivitäten der Colonbakterien. Sie können der intestinalen Mikrobiota als Substrat dienen und möglicherweise deren Zusammensetzung und Fermentationsaktivität beeinflussen.

Anthocyane, die mit menschlichen Stuhlproben anaerob inkubiert wurden, unterlagen einem sehr schnellen Abbau durch fäkale Mikroorganismen. Dabei scheinen als stabiles Abbauprodukt der Anthocyane charakteristische Phenolsäuren zu entstehen [Fleschhut *et al.*, 2006; Keppler und Humpf, 2005; Kemperman *et al.*, 2010]. So wurden aus den Anthocyanen Cyanidin, Malvidin und Peonidin die Phenolsäuren Protocatechusäure, Syringasäure und Vanillinsäure gebildet [Fleschhut *et al.*, 2006; Keppler und Humpf, 2005; Vitaglione *et al.*, 2007]. Durch eine hohe Enzymaktivität der Colonbakterien, wie z.B. β ,D-Glucuronidasen, β ,D-Glucosidasen und α ,L-Rhamnosidasen, werden in einem ersten Schritt Aglykone freigesetzt. Insbesondere *Bacteroides spp.* zählen zu den deglykolisierenden Bakterien, aber auch *Clostridium spp.* und *Streptococcus faecalis* und *Eubacterium rectale*, wurden als solche im menschlichen Colon identifiziert [Clavel *et al.*, 2006; Selma *et al.*, 2009]. Eine *in vitro* Studie von Avila *et al.* (2009) zeigt, dass *Lactobacillus spp.* und *Bifidobacterium spp.* eine hohe β -Glucosidase-Aktivität aufweisen und möglicherweise am Abbau von Anthocyanen durch Spaltung glykosidischer Bindungen und des C-Rings beteiligt sind. Aglykone stellen meist nur ein vorübergehendes Zwischenprodukt dar. Es wird absorbiert oder durch Spaltung des C-Rings weiter zum Aldehyd und entsprechender Phenolsäure abgebaut bzw. metabolisiert (Abb. 2-10). Zum einen begünstigen die pH-Wert-Bedingungen im Colon einen spontanen Zerfall (siehe Kapitel 2.1.2 Abb. 2-3), und zum anderen kann die Spaltung des C-Rings durch Mikroorganismen, wie z.B. *Clostridium spp.* und *Eubacterium spp.*, erfolgen [Aura *et al.*, 2005; Keppler und Humpf, 2005; Selma *et al.*, 2009].

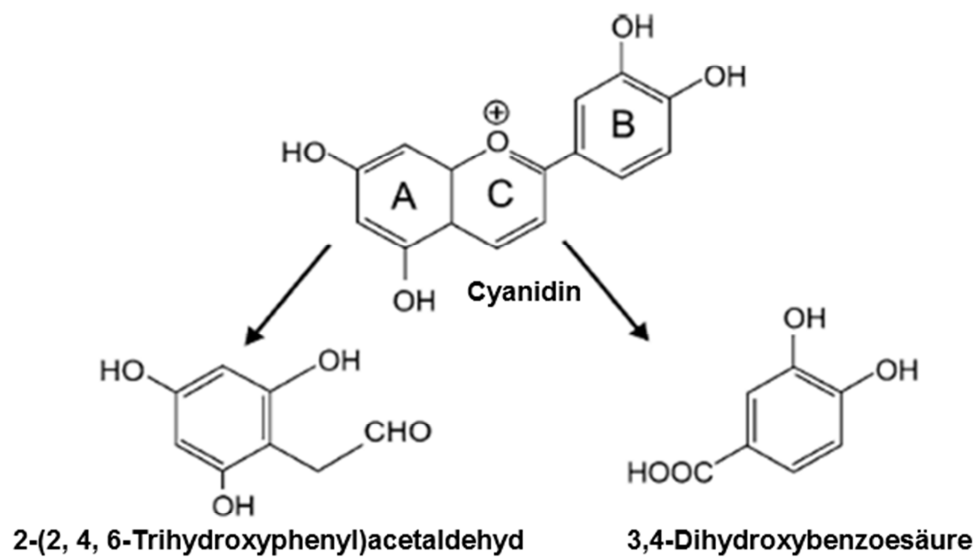


Abb. 2-10 Spaltung des C-Rings von Cyanidin durch Colonbakterien [modifiziert nach Aura *et al.*, 2008]

Auch durch Dehydroxylierung, Demethylierung und Decarboxylierung können Aglykone und Phenolsäuren weiter durch die intestinale Mikrobiota metabolisiert werden. Die mikrobiellen Metabolite können im Colon absorbiert und im Leberstoffwechsel zu glucuronidierten und sulfatierten Anthocyanderivaten umgebildet werden (siehe Kapitel 2.1.2 „Bioverfügbarkeit und Metabolisierung“) [Aura *et al.*, 2008].

Die Umsetzung von Anthocyanen sowie die Konzentration der gebildeten Metabolite und das Metabolitprofil variieren dabei in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota intra- und interindividuell sehr stark [Gross *et al.* 2010; Rechner *et al.* 2004]. Anthocyane können die Bakterienpopulationen der intestinalen Mikrobiota im Wachstum und in der Zusammensetzung beeinflussen [Kemperman *et al.*, 2010], insgesamt liegen jedoch nur wenige Ergebnisse und Kenntnisse zu deren Einfluss auf die intestinale Mikrobiota vor.

In verschiedenen *in vitro* Studien konnten die Adhäsion an Darmepithelzellen und das Wachstum pathogener Bakterien wie *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.*, *Helicobacter pylori*, *Bacillus cereus* und *Escherichia coli* durch anthocyanreiche Beeren, deren Extrakte und Säfte gehemmt werden [Krisch *et al.*, 2008; PuuPonen-Pimia *et al.*, 2005; Selma *et al.*, 2009]. Hidalgo *et al.* (2012) zeigten in einer *in vitro* Studie, dass Malvidin-3-glucosid und Enocianin, ein Lebensmittelfarbstoff aus einem Gemisch von Anthocyanen (E-163), das Wachstum von *Bifidobacterium spp.* und *Lactobacillus-Enterococcus spp.* bei Inkubation menschlicher Stuhlproben unter physiologischen Bedingungen des Colons steigert. Dabei wurden innerhalb der ersten 5 Stunden Malvidin-3-glucosid zu Syringasäure und das Anthocyangemisch Enocianin zu Gallus-, Syringa und p-Coumarsäure abgebaut. Nach Inkubation menschlicher Stuhlproben oder 6-tägiger Fütterung von Ratten mit

anthocyanreichem Blaubeerextrakt wurden Bifidobakterien und Laktobazillen im menschlichen Stuhl bzw. Rattenkot vermehrt [Molan *et al.*, 2009].

In einer Humanstudie kam es nach 20-tägiger Intervention mit täglich 272 ml Rotwein zu einer Veränderung der bakteriellen Zusammensetzung im Stuhl. Dabei vermehrten sich *Enterococcus*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides uniformis*, *Eggerthella lenta* und *Blautia coccoides-Eubacterium rectale* [Queipo-Ortuño *et al.*, 2012]. Allerdings muss hier berücksichtigt werden, dass die gesamten Polyphenole des Rotweins und nicht ausschließlich Anthocyane gewirkt haben dürften. Nach einer 6-wöchigen Intervention mit täglich 375 mg Anthocyanen in Form eines Blaubeersaftes konnte in einer weiteren Humanstudie in Stuhlproben ein signifikanter Anstieg von *Bifidobacterium spp.* und *Lactobacillus acidophilus*, jedoch keine Effekte für *Bacteroides spp.*, *Prevotella spp.*, *Enterococcus spp.* und *Clostridium coccoides* beobachtet werden [Vendrame *et al.*, 2011].

Bislang vorliegende Forschungsergebnisse deuten auf enge Wechselwirkungen zwischen Anthocyanen und intestinalen Mikroorganismen hin. Einerseits werden Anthocyane intensiv durch Colonbakterien metabolisiert, andererseits scheint die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota des Menschen durch Anthocyane und deren Metabolite beeinflusst zu werden. Queipo-Ortuño *et al.* (2012) halten eine präbiotische Wirkung von Anthocyanen bzw. Polyphenolen für möglich. Der Einfluss von Anthocyanen auf die mikrobielle Fermentationsaktivität und Produktion von Fermentationsmetaboliten wie z.B. kurzkettigen Fettsäuren und p-Kresol im Colon des Menschen wurde bisher kaum untersucht. Insgesamt bestehen noch erhebliche Kenntnislücken zur Wirkung und zu den Wirkungsmechanismen von Anthocyanen beim Menschen.

2.2.4 Untersuchung der intestinalen Mikrobiota und bakterieller Fermentationseigenschaften im Colon

Aufgrund der Unzugänglichkeit des Colons ist es eine der größten Herausforderungen bei der Untersuchung der intestinalen Mikrobiota des Menschen, geeignetes Probenmaterial zu gewinnen. In der Literatur sind daher verschiedene methodische Ansätze zu finden. Dazu zählen u.a. *in vitro*-Modelle, Tier- und Zellkulturstudien. Durch die Simulation der physiologischen Bedingungen im Colon kann z.B. in *in vitro*-Modellen die mikrobielle Umsetzung einzelner Substrate und deren Einfluss auf Fermentationseigenschaften der intestinalen Mikrobiota in den verschiedenen Abschnitten des Colons untersucht werden. Allerdings weist ein solches System Grenzen auf, weil die Interaktion zwischen Wirt und Mikrobiota und *in vivo*-Absorptionsvorgänge unberücksichtigt bleiben [De Graaf und Venema, 2008; Minekus *et al.*, 1999; Venema *et al.*, 2004]. Tierstudien bieten durch invasives Vorgehen (z.B. Stomata bei Schweinen; Tötung bei Ratten) die Möglichkeit, Probenmaterial aus verschiedenen Regionen des Colons unter *in vivo*-Bedingungen zu gewinnen. In Zellkulturstudien können die Funktion einer intakten Epithelzellschicht mit Bürstensaum

simuliert und Eigenschaften und Transportvorgänge an isolierten Colonepithelzellen untersucht werden. Die gewonnenen Daten lassen sich allerdings nur begrenzt auf die *in vivo*-Situation beim Menschen übertragen. Zellkulturstudien können *in vivo*-Bedingungen nicht vollständig simulieren und neben anatomischen und physiologischen Unterschieden in Tierstudien besteht eine hohe Wirtsspezifität bezüglich der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota, die unberücksichtigt bleibt [De Graaf und Venema, 2008; Pang *et al.*, 2007]. Mittels mikrobiologischer Kultivierungstechniken lassen sich Bakteriengruppen auf selektiven Nährböden isolieren, quantifizieren und charakterisieren. Das Hauptproblem hierbei liegt in der Notwendigkeit, unter anaeroben Bedingungen arbeiten zu müssen. Dies macht die Gewinnung und Handhabung von Stuhlproben als Probenmaterial besonders schwierig [Bischoff *et al.*, 2009; Zoetendahl *et al.*, 2004]. Molekularbiologische Methoden, basierend auf der 16S rRNA, dienen zur Charakterisierung und Quantifizierung von Bakteriengruppen und Spezies im menschlichen Colon. So können Änderungen in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota aufgezeigt werden. Hierbei finden vorwiegend Stuhlproben als Ausgangs- und Probenmaterial Verwendung [Hamer *et al.*, 2012; Moore *et al.* 2012]. Die Mikrobiota in Stuhlproben ähnelt allerdings hauptsächlich der im distalen Colon. Demnach können mit Stuhlproben keine Informationen über die Mikrobiota in oberen Darmabschnitten gewonnen werden [Bischoff *et al.*, 2009; Eckburg *et al.*, 2005].

Außer der Bestimmung der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota kann die Untersuchung mikrobieller Stoffwechselprodukte, die vom Menschen über den Atem, den Urin und die Fäzes ausgeschieden werden, Informationen über bakterielle Fermentationsaktivitäten und die Mikrobiota im menschlichen Colon liefern [Hamer *et al.*, 2012]. Zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten mikrobiellen Stoffwechselprodukten zählen kurzkettige Fettsäuren im Stuhl, p-Kresol im Urin und die ^{15}N -Ausscheidung im Urin nach Verabreichung von Lactose- ^{15}N , ^{15}N -Ureid (siehe folgendes Kapitel 2.2.5).

Kurzkettige Fettsäuren

Das Maß für bakterielle saccharolytische Fermentation im Colon kann über die Bestimmung kurzkettiger Fettsäuren, hauptsächlich Acetat, Propionat und Butyrat, erfolgen. Nach Zufuhr von Präbiotika konnten steigende Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren in Plasma- und Stuhlproben des Menschen nachgewiesen werden [Jenkins *et al.*, 1998, Nilsson *et al.*, 2010]. Dabei scheint auch das Verhältnis einzelner Fettsäuren zueinander beeinflusst zu werden. In Stuhlproben Übergewichtiger wurde beispielsweise neben einer höheren Gesamtkonzentration kurzkettiger Fettsäuren ein höherer Anteil an Propionat gefunden [Hamer *et al.*, 2012; Schwartz *et al.*, 2010]. Allerdings können bis zu 95 % der gebildeten kurzkettigen Fettsäuren vom Wirt absorbiert und metabolisiert werden, sodass es schwierig ist, die *in situ*-Produktion und -Konzentration kurzkettiger Fettsäuren im Colon zu erfassen [Hamer *et al.*,

2010]. Ergänzend zu den kurzkettigen Fettsäuren kann der pH-Wert in Stuhlproben zur Beurteilung des intestinalen Milieus im distalen Colon herangezogen werden. In Stuhlproben von Kolorektalkarzinom-Patienten wurde im Vergleich zu Gesunden neben einer verminderten Konzentration kurzkettiger Fettsäuren ein erhöhter pH-Wert nachgewiesen [Oligashi *et al.* 2013]. Der pH-Wert ist maßgeblich von der Konzentration kurzkettiger Fettsäuren abhängig. Nach intensiver saccharolytischer Fermentationsaktivität der Colonbakterien und damit hoher Produktion kurzkettiger Fettsäuren sind daher pH-Werte im sauren und nach proteolytischer Fermentation solche im basischen Bereich zu erwarten.

***p*-Kresol**

p-Kresol ist eine aromatische Verbindung und entsteht im menschlichen Organismus ausschließlich als bakterielles Fermentationsprodukt der Aminosäure Tyrosin im Darm. Nach Absorption im Darm, Passage der Leber und des systemischen Kreislaufs wird p-Kresol über den Urin wieder ausgeschieden [Vanholder *et al.*, 2011, De Loor, 2005]. Als p-Kresol bildende Bakterien sind besonders anaerobe Bakterien der Darmmikrobiota bekannt. Dazu zählen *Staphylococcus albus*, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium sp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.* [Bone *et al.*, 1976]. P-Kresol gilt als gesundheitsschädlich für den menschlichen Organismus. Es konnten toxische Wirkungen auf Leberzellen, eine Schädigung des Endothels und eine verminderte Wundheilung und Leukozytenaktivität für p-Kresol gezeigt werden [Abreo *et al.*, 1997; De Smet *et al.*, 2003; Dou *et al.*, 2004]. Die p-Kresol-Ausscheidung im Urin kann als Maß für proteolytische Fermentationsaktivitäten der Bakterien im menschlichen Colon herangezogen werden. Während eine hohe Proteinaufnahme über die Nahrung zu einer erhöhten p-Kresol-Konzentration im Urin führt, kann z.B. die Aufnahme von Oligofructose die renale p-Kresol-Ausscheidung verringern. Dies ist für den Menschen als gesundheitlich positiv zu bewerten [De Preter *et al.*, 2007; De Preter *et al.*, 2008; Geboes *et al.*, 2005; Geypens *et al.*, 1997].

***NH₃*-Stoffwechsel im Colon**

Die luminale Ammoniakkonzentration im Colon ist das Resultat bakterieller Fermentation von Proteinen, Aminosäuren und Urea. Sie steigt durch eine erhöhte Proteinaufnahme über die Nahrung an [Davila *et al.*, 2013; Geypens *et al.*, 1997]. Für Ammoniak konnten verschiedene biologische Wirkungen wie Hemmung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs und Oxidation kurzkettiger Fettsäuren oder Erhöhung der parazellulären Permeabilität gezeigt werden, die letztlich zu einer Schädigung des Darmepithels führen. Des Weiteren kann eine erhöhte Ammoniakkonzentration im Blutkreislauf neurotoxische Wirkungen und eine hepatische Enzephalopathie begünstigen [Davila *et al.*, 2013; Hamer *et al.*, 2012]. Die Entfernung von Ammoniak aus dem Lumen des Colon ist daher von gesundheitlichem

Nutzen für den Wirt. Die Stimulierung der Fermentationsaktivität und Proliferation von Mikroorganismen im Colon, z.B. durch Präbiotika, führt zu einer erhöhten bakteriellen Proteinsynthese. Die Colonbakterien können dabei luminales Ammoniak als N-Quelle nutzen und aufnehmen. Dadurch wird Ammoniak aus dem Lumen des Colon entfernt und in Form von Bakterien über die Fäzes ausgeschieden. Lactose- ^{15}N , ^{15}N -Ureid bietet eine Möglichkeit zur *in vivo*-Untersuchung des bakteriellen Ammoniak- und N-Stoffwechsels im Colon des Menschen.

2.2.5 Lactose- ^{13}C -Ureid und Lactose- ^{15}N , ^{15}N -Ureid

Glykosylureide sind Kondensationsprodukte aus einem reduzierenden Zucker und Harnstoff. Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieb Schoorl (1903) ein Syntheseverfahren, bei dem in einer verdünnten Säurelösung ein Zucker mit Harnstoff zu einer kristallinen Substanz kondensiert. Dabei sind verschiedene Substitutionen am Zuckermolekül möglich, wie z.B. Glucose, Cellobiose oder Lactose. In der Literatur ist die Anwendung und Untersuchung verschiedener Glykosylureide mit ^{13}C und/oder ^{15}N -markiertem Harnstoff als Tracersubstanz im Gastrointestinaltrakt beschrieben [Morrison *et al.*, 2003; Wutzke, Glasenapp, 2004]. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die Anwendung von Lactose- ^{13}C -Ureid (^{13}C -LU) und Lactose- ^{15}N , ^{15}N -Ureid ($^{15}\text{N}_2$ -LU) (Abb. 2-11).

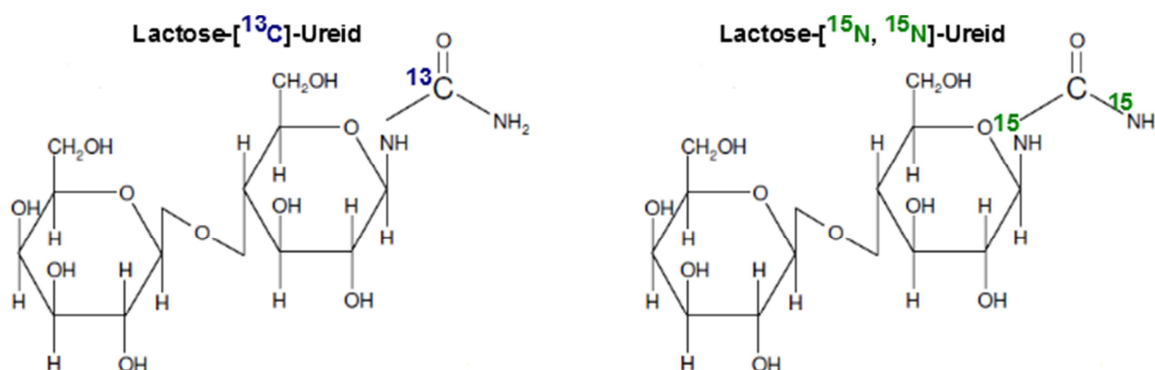


Abb. 2-11 Strukturformel von Lactose- ^{13}C -Ureid und Lactose- ^{15}N , ^{15}N -Ureid [modifiziert nach Morrison *et al.*, 2003]

Metabolisierung von Lactose-[^{13}C]-Ureid und Lactose-[^{15}N , ^{15}N]-Ureid

Nach oraler Aufnahme von Lactoseureid wird während des Transports durch den Dünndarm die Disaccharid-Bindung durch menschliche Lactase hydrolysiert und Galactose und Glucoseureid freigesetzt. Die Kohlenhydrat-Harnstoff-Bindung von Glykosylureiden bzw. ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU kann durch menschliche Verdauungsenzyme nicht gespalten werden. Die Freisetzung des Harnstoffs und des Isotopen-markierten Kohlenstoffs (^{13}C) und Stickstoffs (^{15}N) erfolgt erst im Colon durch bakterielle Enzyme. Vermutlich wird im ersten Schritt durch bakterielle Allantoat-Amidinohydrolase die Bindung zwischen Harnstoff und Lactose bzw. Glucose und in einem zweiten Schritt durch bakterielle Ureasen der Harnstoff hydrolysiert. Beim Einsatz von ^{13}C -LU wird dabei $^{13}\text{CO}_2$ und NH_3 und beim Einsatz von $^{15}\text{N}_2$ -LU CO_2 und $^{15}\text{NH}_3$ freigesetzt. Als Glykosylureid-spaltendes Bakterium (Kohlenhydrat-Harnstoff-Bindung, Schritt 1) wurde in menschlichen Stuhlproben *Clostridium innocuum* identifiziert. Diese Spezies zählt zur normalen intestinalen Mikrobiota des Menschen [Heine *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1999; Mohr *et al.*, 1999; Morrison *et al.*, 2003; Ruemmele *et al.*, 1997]. Harnstoff wird nach der Spaltung der Kohlenhydrat-Harnstoff-Bindung durch bakterielle Ureasen im Colon hydrolysiert (Abb. 2-12). Eine Hydrolyse des Harnstoffs durch *Helicobacter pylori* im Magen wird somit ausgeschlossen [Hamer *et al.*, 2012; Heine *et al.*, 1995].

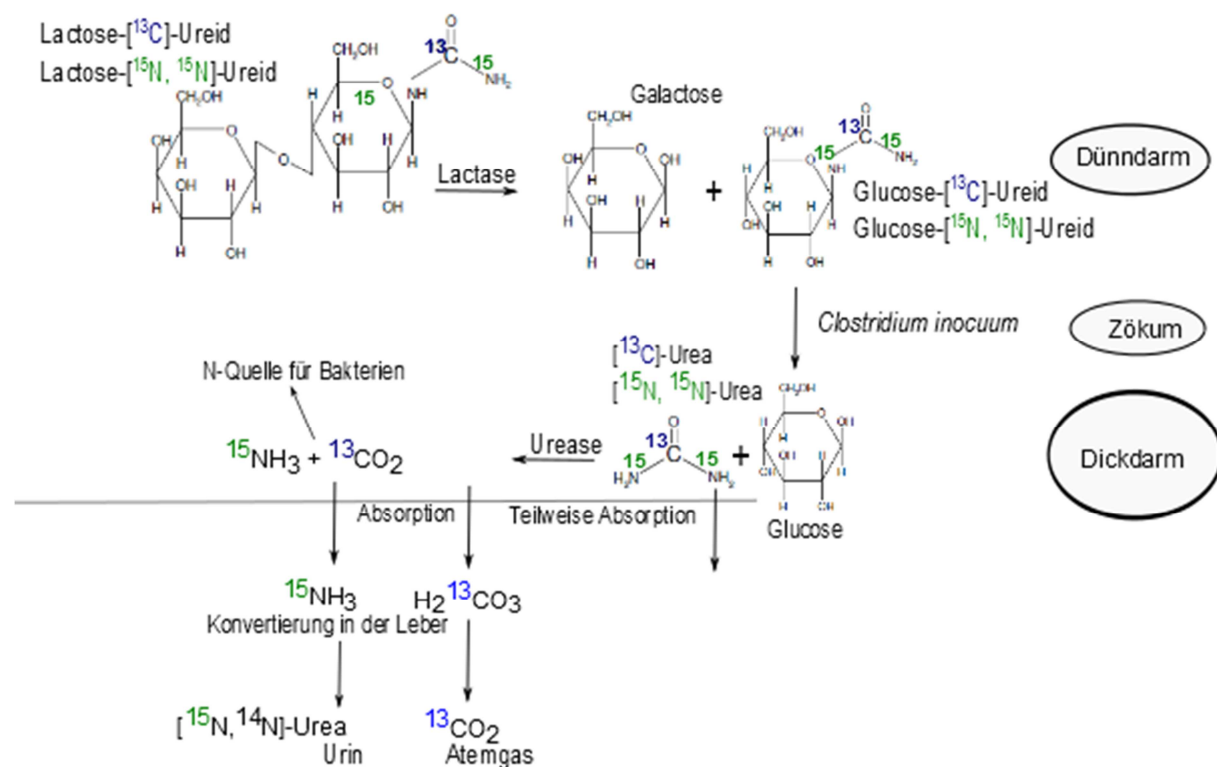


Abb. 2-12 Intestinale Metabolisierung von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU [modifiziert nach De Preter *et al.*, 2011; Wutzke und Glasenapp, 2004]

Während das freigesetzte $^{13}\text{CO}_2$ über den Bicarbonat-Körperpool zur Lunge gelangt und abgeatmet wird, wird freigesetztes $^{15}\text{NH}_3$ entweder von Colonbakterien aufgenommen, als N-Quelle genutzt und über die Fäzes ausgeschieden oder es gelangt nach Absorption zur Leber, wo es zu ^{15}N , ^{14}N -Urea resynthetisiert wird und über den Urin ausgeschieden wird. Die $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas nach Aufnahme von ^{13}C -LU kann einerseits zur Bestimmung der oroökalen-Transitzeit und andererseits als Maß für die bakterielle Hydrolyse von Harnstoff bzw. metabolische Aktivität der Colonbakterien dienen. Die ^{15}N -Exkretion im Urin nach Aufnahme von $^{15}\text{N}_2$ -LU liefert Informationen über bakterielle, vorwiegend proteolytische Fermentationsvorgänge im Colon. Eine erhöhte proteolytische Fermentationsaktivität der Colonbakterien resultiert nach Aufnahme von $^{15}\text{N}_2$ -LU in einer gesteigerten Bildung und Absorption von $^{15}\text{NH}_3$ im Colon und einer höheren ^{15}N -Ausscheidung im Urin. Gleichzeitig können Hinweise über den Fermentationsort im Colon gewonnen werden, da eine distale Fermentation im Vergleich zu einer proximalen Fermentation zu einer verzögerten ^{15}N -Ausscheidung im Urin führt. Dies ist mit einer erhöhten ^{15}N -Anreicherung in späteren Urinfraktionen nachweisbar [Cloetens *et al.*, 2008; De Preter *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 1999].

Insgesamt können die Wiederfindung von $^{13}\text{CO}_2$ im Atemgas bzw. die $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofile und die ^{15}N -Anreicherung im Urin als nicht-invasive Marker zur *in vivo*-Untersuchung mikrobieller Fermentationsaktivitäten der Mikrobiota im menschlichen Colon dienen. Der Nachweis von ^{13}C im Atemgas und ^{15}N im Urin ist durch massenspektrometrische Isotopenhäufigkeitsmessung möglich. In Tabelle 1 sind Studien zur Metabolisierung von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU und zur Anwendung von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU in Untersuchungen der intestinalen Mikrobiota des Menschen aufgeführt.

Die Metabolisierung von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU beim Menschen scheint interindividuellen Unterschieden zu unterliegen, erkennbar durch $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofile und ^{15}N -Exkretionsmuster im Urin. Unabhängig davon werden ca. 80 % der verabreichten ^{13}C -Dosis innerhalb von 48 Stunden nach Aufnahme von ^{13}C -LU über den Atem ausgeschieden und ca. 35 % innerhalb der ersten 24 Stunden [Jackson *et al.*, 1999; Wutzke *et al.*, 1997]. Beim Einsatz von $^{15}\text{N}_2$ -LU werden innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme zwischen ca. 35-50 % der verabreichten ^{15}N -Dosis wieder im Urin ausgeschieden [Cloetens *et al.*, 2008; De Preter *et al.*, 2007; Wutzke *et al.*, 2010]. Bei der ^{15}N -Ausscheidung im Urin kann zwischen unterschiedlichen Metaboliten differenziert werden [Jackson *et al.*, 1999]. So wurde innerhalb der ersten 6 Stunden nach Aufnahme von $^{15}\text{N}_2$ -LU ein geringer Teil des detektierten ^{15}N im Urin in Form von Glucose- ^{15}N , ^{15}N -Ureid ausgeschieden [De Preter *et al.*, 2011]. Ca. 5 % der verabreichten ^{15}N -Dosis in Form von $^{15}\text{N}_2$ -LU wurden in den Untersuchungen von Jackson *et al.* (1999) nach dem ersten bakteriellen Hydrolyseschritt, der Kohlenhydrat-Harnstoff-Spaltung, als ^{15}N , ^{15}N -Urea im Darm absorbiert und in dieser

Form wieder im Urin ausgeschieden. Der Großteil des freigesetzten $^{15}\text{NH}_3$ wird durch Colonbakterien metabolisiert und kann als N-Quelle zur Synthese von Aminosäuren, wie Glycin, Alanin und Lysin, dienen, die dem Wirt verfügbar sind [Jackson *et al.*, 2004]. 24 % der verabreichten ^{15}N -Dosis wurden innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme von $^{15}\text{N}_2$ -LU als [^{15}N , ^{14}N]-Urea im Urin ausgeschieden [Jackson *et al.*, 1999]. Dem muss eine bakterielle Metabolisierung, eine anschließende Absorption und Resynthese in der Leber zu [^{15}N , ^{14}N]-Urea vorausgegangen sein. Eine Differenzierung der verschiedenen ^{15}N -Ausscheidungsprodukte im Urin, wie Glucose-[^{15}N]-Ureid, [^{15}N , ^{15}N]-Urea und [^{15}N , ^{14}N]-Urea, ist methodisch/analytisch sehr schwierig und aufwendig. Daher wird in den meisten Studien die kumulative ^{15}N -Ausscheidung in einzelnen Urinfraktionen (0-6 h, 6-24 h) nach Aufnahme von $^{15}\text{N}_2$ -LU bestimmt. Dieses Vorgehen hat sich in verschiedenen Studien als gängiges Verfahren zur Untersuchung des mikrobiellen N-Stoffwechsels im Colon bewährt [Cloetens *et al.*, 2008; De Preter *et al.*, 2006; De Preter *et al.*, 2011; Wutzke *et al.*, 2010].

Tab. 2-3 Ausgewählte Studien zur Metabolisierung und Anwendung von Lactose-[¹³C]-Ureid (¹³C-LU) und Lactose-[¹⁵N, ¹⁵N]-Ureid (¹⁵N₂-LU) (¹³C-GU: Glucose-[¹³C]-Ureid)

Studie	Population	Intervention	Untersuchungsziel/Parameter	Ergebnis
Heine <i>et al.</i> , 1995	6 Frauen, 9 Männer; Alter: 18-62 Jahre	[¹³ C]-LU, [¹³ C]-Lactose, Arabinose-[¹³ C]-Ureid, Diarabinose-[¹³ C]-Ureid, Cellobiose-[¹³ C]-Ureid 28 h	Testsubstrat zur Untersuchung der intestinalen Transitzeit ¹³ CO ₂ -Abatmung	Keine ¹³ CO ₂ -Abatmung nach Arabinose und Diarabinose; ¹³ CO ₂ -Atemgaszeitprofil ähnlich nach Lactose- [¹³ C]-Ureid und Cellobiose-[¹³ C]-Ureid
Wutzke <i>et al.</i> , 1997	10 Männer, 2 Frauen; Alter: 26-64 Jahre	¹³ C, ¹⁵ N ₂ -LU, Vordosierung 5 x 1g Lactoseureid, dann ¹³ C- LU, ¹⁵ N ₂ -LU	Untersuchung der oroökalen Transitzeit über ¹³ CO ₂ Abatmung und H ₂ -Atemtest über 24 h, ¹³ C- und ¹⁵ N-Ausscheidung im Urin über 30 h	¹³ CO ₂ -Abatmung geeignet zur Bestimmung der oroökalen Transitzeit; 29,9 % bzw. 13,6 % der verabreichten Dosis ¹⁵ N und ¹³ C im Urin ausgeschieden
Jackson <i>et al.</i> , 1999	6 Frauen, 3 Männer; Alter: 19-26 Jahre	¹³ C-LU, ¹⁵ N ₂ -LU	Metabolisierung von ¹³ C-LU und ¹⁵ N ₂ -LU beim Menschen; ¹³ CO ₂ -Abatmung; (¹⁵ N, ¹⁴ N)-Urea, (¹⁵ N, ¹⁵ N)-Urea in Urin und Stuhl	3 unterschiedliche Atemgas- und (¹⁵ N, ¹⁴ N)-Urea und (¹⁵ N, ¹⁵ N)-Urea Urinausscheidungsprofile; 22 % der verabreichten Dosis ¹⁵ N im Stuhl, 73 % absorbiert davon 24 % als (¹⁵ N, ¹⁴ N)-Urea im Urin ausgeschieden, 5 % als (¹⁵ N, ¹⁵ N)-Urea renal ausgeschieden
Morrison <i>et al.</i> , 2003	2 Frauen, 2 Männer; Alter: 24-47 Jahre	¹³ C-LU, ¹³ C-GU	Metabolisierung von ¹³ C-Glykosylureiden; ¹³ CO ₂ -Abatmung; ¹³ C, ¹³ C-Urea, ¹³ C-GU im Urin	Ähnliche Metabolisierung von ¹³ C-GU und ¹³ C-LU; Höchste ¹³ C-Ausscheidung im Urin als ¹³ C-GU; Vordosierung erhöht Ausscheidung
De Preter <i>et al.</i> , 2004	9 Frauen, 10 Männer; Alter: 22-45 Jahre	¹⁵ N ₂ -LU	Einfluss von Prä- und Probiotika auf die intestinale Mikrobiota; ¹⁵ N im Urin	Verminderte ¹⁵ N-Ausscheidung nach Zufuhr von Prä- und Probiotika
Jackson <i>et al.</i> , 2004	6 Frauen, 3 Männer; Alter: 19-26 Jahre	¹⁵ N ₂ -LU	¹⁵ N-Anreicherung in Aminosäuren aus Urin- und Stuhlproben	¹⁵ N-Anreicherung in fäkalem bakteriellem Glycin, Alanin, Lysin und Histidin, in Glycin, Alanin und Lysin im Urin
Geboes <i>et al.</i> , 2005	6 Männer, 8 Frauen;	¹⁵ N ₂ -LU	Metabolisierung von ¹⁵ N ₂ -LU im Colon und Einfluss von Inulin; ¹⁵ N-Ausscheidung im Urin	Verminderte ¹⁵ N-Ausscheidung durch Zufuhr von Inulin; ¹⁵ N- Ausscheidungsprofil im Urin ähnlich zwischen Versuchspersonen

Fortsetzung Tab. 2-3 Ausgewählte Studien zur Metabolisierung und Anwendung von Lactose-[^{13}C]-Ureid (^{13}C -LU) und Lactose-[^{15}N , ^{15}N]-Ureid ($^{15}\text{N}_2$ -LU) (^{13}C -GU: Glucose-[^{13}C]-Ureid)

Studie	Population	Intervention	Untersuchungsziel/Parameter	Ergebnis
Wutzke, Glasenapp, 2004	4 Männer, 4 Frauen; Alter: 22-55 Jahre	Cellubiose-[^{13}C]-Ureid, ^{13}C -GU	Untersuchung der oroökalen-Transitzeit; $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung	Vordosierung mit unmarkierten Glykosylureiden führt zur exakteren Bestimmung der oroökalen Transitzeit.
Geboes <i>et al.</i> , 2006	2 Männer, 5 Frauen	$^{15}\text{N}_2$ -LU	^{15}N -Ausscheidung in Urin und Fäzes; Einfluss von Inulin	Gleichzeitige Zufuhr von Inulin und $^{15}\text{N}_2$ -LU führte zu verminderter ^{15}N -Ausscheidung im Urin und erhöhter Ausscheidung im Stuhl; Langfristige Zufuhr zeigte keinen eindeutigen Einfluss von Inulin auf die ^{15}N -Ausscheidung
De Preter, Verbeke, 2006	5 Männer, 5 Frauen; Alter: im Mittel 25 Jahre	$^{15}\text{N}_2$ -LU	Einfluss der Vordosierung mit unmarkiertem LU; ^{15}N -Ausscheidung im Urin	Kein Unterschied in der renalen ^{15}N -Ausscheidung mit oder ohne Vordosierung mit 1g unmarkiertem LU
De Preter <i>et al.</i> , 2007	10 Männer, 10 Frauen; Alter: 21 ± 1 Jahre	4-wöchige Intervention mit: Probiotika: <i>L. casei</i> ; <i>B. breve</i> ; Präbiotika: Inulin; Messtage vor und nach 4-wöchiger Intervention mit $^{15}\text{N}_2$ -LU	Kurz- und langfristiger Effekt von Pro- und Präbiotika auf p-Kresol und ^{15}N -Ausscheidung im Urin, ^{15}N -Gehalt und Quantifizierung von Bifidobakterien im Stuhl	Verminderte p-Kresol und ^{15}N -Ausscheidung im Urin nach kurz- und langfristiger Zufuhr von Inulin, erhöhter ^{15}N -Gehalt im Stuhl nach kurzfristiger Zufuhr von Inulin, langfristige Zufuhr von Inulin erhöhte Bifidobakterien im Stuhl; verminderte p-Kresol Ausscheidung nach langfristiger Zufuhr von <i>L. casei</i> und <i>B. breve</i>
Wutzke, Schütt 2007	4 Männer, 11 Frauen; Alter: 19-54 Jahre	^{13}C -LU, Vordosierung 5 x 100 mg LU	Untersuchung der Vordosierung auf oroökale Transitzeit über $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung	Vordosierung mit LU für Enzyminduktion und zur realistischen Bestimmung der oroökalen Transitzeit mittels ^{13}C -LU nötig.
Cloetens <i>et al.</i> , 2008	4 Männer, 6 Frauen, Alter: 24 ± 1 Jahre; 4 Männer, 6 Frauen. Alter: 26 ± 8 Jahre	2-wöchige Intervention mit resistenter Stärke, Weizenkleie, $^{15}\text{N}_2$ -LU	Kurz- und langfristiger Effekt von resistenter Stärke und Weizenkleie auf ^{15}N -Ausscheidung im Urin und Stuhl	Verminderte ^{15}N -Ausscheidung im Urin nach kurz- und langfristiger Zufuhr von resistenter Stärke

Fortsetzung Tab. 2-3 Ausgewählte Studien zur Metabolisierung und Anwendung von Lactose-[¹³C]-Ureid (¹³C-LU) und Lactose-[¹⁵N, ¹⁵N]-Ureid (¹⁵N₂-LU) (¹³C-GU: Glucose-[¹³C]-Ureid)

Studie	Population	Intervention	Untersuchungsziel/Parameter	Ergebnis
Wutzke, Mix 2010	4 Männer, 9 Frauen; Alter: 22-58 Jahre	Lactose-[¹³ C, ¹⁵ N]-Ureid, Vordosierung mit Glucoseureid, Cellobioseureid	Untersuchung der oroökalen Transitzeit und Enzyminduktion durch Ureide; ¹³ CO ₂ - Abatmung, ¹³ C- und ¹⁵ N-Ausscheidung im Urin und Stuhl	Vordosierung mit Ureiden erlaubt Bestimmung der realistischen oroökalen Transitzeit
Wutzke <i>et al.</i> , 2010	5 Männer, 9 Frauen; Alter: 20-28 Jahre	10-tägige Intervention mit Präbiotika: Ballaststoffen, resistenter Stärke und Probiotika: <i>L. acidophilus</i> ; ¹⁵ N ₂ -LU	Einfluss von Pro- und Präbiotika auf ¹⁵ N- Ausscheidung im Urin und Stuhl	Verminderte ¹⁵ N-Ausscheidung im Urin nach Präbiotikazufuhr
De Preter <i>et al.</i> , 2011	10 Männer, 9 Frauen; Alter: im Mittel 22 Jahre	¹⁵ N ₂ -LU	Quantifizierung von Glucose-[¹⁵ N, ¹⁵ N]-ureid im Urin	Glucose-[¹⁵ N, ¹⁵ N]-ureid-Anteil ist konstant im Urin nach Aufnahme von ¹⁵ N ₂ -LU

Zusammenfassend lassen sich die Studien zu ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU bzw. $^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2$ -LU (doppelmarkiertes LU) nach drei Untersuchungsschwerpunkten aufteilen in

1. Untersuchungen zur Metabolisierung von ^{13}C -LU, $^{15}\text{N}_2$ -LU bzw. $^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2$ -LU (*in vitro* und *in vivo*)
2. Einsatz von ^{13}C -LU zur Bestimmung der oroökalen Transitzeit (*in vivo*)
3. Anwendung von ^{13}C -LU, $^{15}\text{N}_2$ -LU bzw. $^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2$ -LU zur Untersuchung mikrobieller Fermentationsvorgänge bzw. des intestinalen N-Stoffwechsels im Colon, z.B. vor und nach Nahrungsinterventionen mit Pro- oder Präbiotika (*in vivo*)

Eine Aktivierung der bakteriellen Enzyme zur Spaltung von Lactoseureid durch eine Vordosierung mit unmarkiertem Lactoseureid am Versuchsvortag führt zu einem früheren $^{13}\text{CO}_2$ -Anstieg im Atemgas nach Aufnahme von ^{13}C -LU. Zur Bestimmung der oroökalen Transitzeit beim Menschen mit ^{13}C -LU scheint daher eine Vordosierung mit unmarkiertem Lactoseureid nötig, da der erste $^{13}\text{CO}_2$ -Anstieg die oroökale Transitzeit widerspiegelt und detektiert werden sollte [Wutzke *et al.*, 1997; Wutzke und Schütt 2007]. Die ^{15}N -Ausscheidung nach oraler Aufnahme von $^{15}\text{N}_2$ -LU kann als nicht invasiv gewonnener Parameter zur *in vivo*-Untersuchung des mikrobiellen N-Stoffwechsels im Colon dienen, wobei eine Vordosierung weniger nützlich erscheint [De Preter *et al.*, 2006]. Die gemeinsame Anwendung von $^{15}\text{N}_2$ -LU und ^{13}C -LU zur Beurteilung mikrobieller Fermentationsvorgänge im Colon nach Nahrungsinterventionen, insbesondere hinsichtlich der Wirkung von Anthocyanen auf die intestinale Mikrobiota des Menschen, ist bisher kaum untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Humanstudie I

Ziel der Humanstudie I war es, mithilfe von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU den „langfristigen“ Effekt von Fruchsaftgetränken mit unterschiedlichem Anthocyan- und Ballaststoffgehalt auf die intestinale Mikrobiota im menschlichen Colon zu untersuchen. Die Studie wurde vor Beginn von der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen auf deren Unbedenklichkeit geprüft und genehmigt (Vorlage-Nr. 31/10).

3.1.1 Testgetränke

Als Testgetränke stellte der Fachbereich für Weinanalytik und Getränkforschung der Forschungsanstalt Geisenheim (Frau Fröhling, Prof. Will und Prof. Dietrich) einen anthocyanreichen, ballaststoffarmen **Traube-Heidelbeer-Saft**, einen anthocyan- und ballaststoffreichen **Traube-Heidelbeer-Smoothie** und einen anthocyan- und ballaststoffarmen **Traube-Heidelbeer-Placebosaft** zur Verfügung. Der Traubensaft wurde aus den anthocyanreichen Sorten *Dakapo* und *Accent* hergestellt und in einem Verhältnis von 80:20 mit Heidelbeersaftkonzentrat verschnitten. Der Smoothie wurde analog dazu hergestellt, wobei der Heidelbeeranteil von 20 % als Püree zum Traubensaft hinzugefügt und diese Mischung vor der Flaschenabfüllung homogenisiert wurde. Zur Herstellung des polyphenolarmen Placebosaftes wurde der Traube-Heidelbeersaft über eine Kronlab Pilot-Säule (20 cm Durchmesser), gefüllt mit 16 L SP 70 Harz (Resindion/Mitsubishi), gegeben und das erste Eluat aufgefangen. Alle Testgetränke wurden in 0,33 l Braunglasflaschen abgefüllt und bis zur Verwendung dunkel bei 4 °C gelagert. Tabelle 3-1 zeigt ausgewählte analytische Kennzahlen der Testgetränke.

Tab. 3-1 Analytische Kennzahlen der Testgetränke

Parameter	Traube-Heidelbeer-Saft	Traube-Heidelbeer-Smoothie	Traube-Heidelbeer-Placebo
Saftverhältnis [Traube/Heidelbeere]	80:20	80:20	80:20
Reduzierende Zucker [g/l]	175,3	172	154,6
Glucose [g/l]	84,6	85,6	76,2
Fructose [g/l]	89,2	88,6	78,4
Gesamtphenole [mg/l]	3227	3435	179
Anthocyane [mg/l]	840,9	983,7	8,9
Ballaststoffe [g/100ml]	0,7	1,1	0,4

In den folgenden Textabschnitten und zur Darstellung der Ergebnisse wird der Traube-Heidelbeer-Saft als „Saft“, der Traube-Heidelbeer-Smoothie als „Smoothie“ und der Traube-Heidelbeer-Placebosaft als „Placebo“ bezeichnet.

3.1.2 Lactose-[¹³C]-Ureid und Lactose-[¹⁵N₂]-Ureid

Lactose-[¹³C]-Ureid (¹³C-LU) und [¹⁵N, ¹⁵N]-Urea wurden von Euriso-top (CLM-4518 bzw, NLM-233, Saint-Aubin) bezogen. Lactose-[¹⁵N₂]-Ureid (¹⁵N₂-LU) wurde aus [¹⁵N, ¹⁵N]-Urea und Lactose vom Institut für organische Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Prof. Maison) nach Schoorl (1903), modifiziert nach Hofmann (1931), synthetisiert. Zur Herstellung einer Trinklösung wurden zu jedem Messtag je Probandin 500 mg ¹³C-LU und 75 mg ¹⁵N₂-LU in 100 ml Wasser (Aqua ad iniectiones, Baxter, Unterschleißheim) im Ultraschallbad gelöst und in 100 ml verschließbaren Braunglasflaschen bereitgestellt.

3.1.3 Studienteilnehmer

An der Studie nahmen 30 weibliche Probandinnen im durchschnittlichen Alter von 25±1 Jahren (23-27 Jahren) und einem mittleren Body Mass Index (BMI) von 21,2±2,4 kg/m² (18,2-28 kg/m²) teil. Anthropometrische Daten der einzelnen Probandinnen sind im Anhang A-1 aufgeführt. Die Probandinnen wurden über den Inhalt und Ablauf der Studie sowie mögliche Risiken aufgeklärt. Voraussetzung für eine Teilnahme war die Abgabe einer schriftlichen Einverständniserklärung. Alle Probandinnen waren zu Interventionsbeginn gesund und hatten in den letzten 3 der Untersuchung vorausgehenden Monaten weder Vitaminpräparate noch Medikamente eingenommen.

3.1.4 Studiendesign

Es handelte sich um eine Doppelblind-Studie in drei Durchgängen, randomisiert und Placebo-kontrolliert, über jeweils 14-tägige Interventionsabschnitte mit jeweils vorgeschalteten 10-tägigen Washoutabschnitten. Die Probandinnen erhielten während der Interventionsabschnitte täglich 330 ml eines der Testgetränke zum Frühstück. Nach den Interventionsabschnitten folgte ein 4-tägiger „Nullabschnitt“, in dem die Probandinnen keinen Einschränkungen in der Ernährung unterlagen (siehe Studiendesign Abb. 3-1).

Während des gesamten Studienzeitraums, ausgenommen die 4-tägigen „Nullabschnitte“, unterlagen die Probandinnen Ernährungsrichtlinien, die eine anthocyan- und polyphenolarme Ernährung gewährleisten sollten. Außerdem war es nicht erlaubt, Lebensmittel aufzunehmen, bei denen ein Einfluss auf die intestinale Mikrobiota zu erwarten war. Hierzu zählten neben ballaststoffreichen Lebensmitteln auch pro- und präbiotische Produkte. Die Probandinnen erhielten dazu eine Liste, in der „erlaubte“ „eingeschränkt erlaubte“ und „verbotene“ Lebensmittel eingeordnet waren (siehe Anhang A-2).

3.1.5 Messtage

An den Messtagen wurde den Probandinnen jeweils vor und nach den Interventionsabschnitten die ^{13}C - und $^{15}\text{N}_2$ -LU Trinklösung oral verabreicht. Vor der Einnahme von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU wurde von jeder Probandin jeweils eine Atemgas- und Urinprobe zur Bestimmung der Basiswerte von $^{13}\text{CO}_2$ im Atem und der ^{13}C - und ^{15}N -Anreicherung sowie der p-Kresolausscheidung im Urin gesammelt. Nach Aufnahme von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU wurden an den Messtagen über einen Zeitraum von 36 Stunden Atemgasproben zu folgenden Zeitpunkten gesammelt:

- Direkt **vor** Aufnahme von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU (Basiswert)
- **Nach** Aufnahme von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU:
 - o Nach 6 Stunden
 - o Stündlich zwischen 6-24 Stunden
 - o Nach 30 Stunden
 - o Stündlich zwischen 30-36 Stunden

Urinproben wurden über 30 Stunden in folgenden Fraktionen gesammelt:

- Direkt **vor** Aufnahme von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU (Basiswert)
- **Nach** Aufnahme von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU in den Fraktionen:
 - o 0-6, 6-9, 9-12, 12-15, 15-18, 18-21, 21-24, 24-30 Stunden

Eine Ausnahme stellt Messtag 1 dar, an dem über 30 Stunden Atemgas- und über 24 Stunden Urinproben gesammelt wurden.

Zu jedem Messtag entnahmen die Probandinnen außerdem jeweils zwei Stuhlproben, eine innerhalb der letzten 48 Stunden **vor** und eine innerhalb von 48 Stunden **nach** Einnahme des ^{13}C - und $^{15}\text{N}_2$ -markierten Lactoseureids (siehe Studiendesign Abb. 3-1). Diese dienten zur mikrobiologischen Untersuchung (Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikum Gießen Marburg, Standort Gießen, Prof. Domann) und zur Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren, des pH-Wertes und der Gesamtkeimzahl.

Die Probandinnen wurden angewiesen, sich an den 6 Messtagen möglichst „standardisiert“ zu ernähren. Die Mittagsmahlzeit bestand aus einem Nudelgericht, einer Beilage (Salat oder Nachtisch) und einem Getränk und wurde jeweils in der Mensa der Universität Gießen (Otto-Egerheim) um 12:30 Uhr eingenommen. Dabei wurden die Ernährungsrichtlinien (siehe A-2) der Studie berücksichtigt. Ein detaillierter Ablaufplan zur Durchführung eines Messtages wurde den Probandinnen ausgehändigt und ist im Anhang beigelegt (siehe A-3).

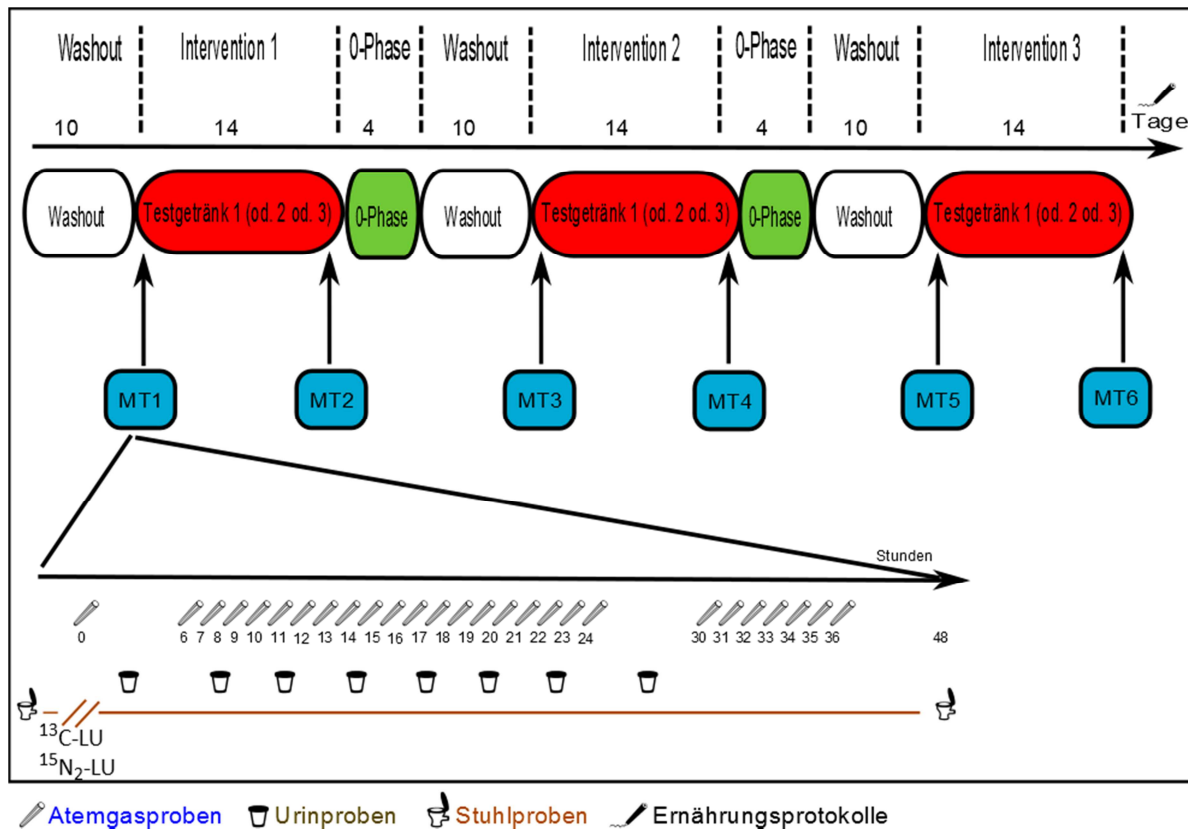


Abb. 3-1 Studiendesign der Humanstudie I, Interventionsstudie (MT = Messtag, Testgetränk 1 = Smoothie, Testgetränk 2 = Saft, Testgetränk 3 = Placebo)

3.1.6 Probenmanagement

Vor Studienbeginn erhielten alle Probandinnen eine Einweisung zur Sammlung der Atemgas-, Urin- und Stuhlproben und detaillierte Anweisungen zum Messtag durch einen ausgehändigten Ablaufplan (siehe A-2).

3.1.6.1 Atemgasproben

Die Sammlung der Atemgasproben erfolgte in Glasröhrchen mit einem Gummistopfen (BD Vacutainer). Die Probandinnen pusteten dazu durch einen Strohhalm zu den entsprechenden Zeitpunkten für 1-2 Sekunden in das Glasröhrchen. Dieses wurde sofort mit dem Gummistopfen fest verschlossen, bei der Studienleitung abgegeben und bis zur Analyse bei Raumtemperatur gelagert.

3.1.6.2 Urinproben

Die Probandinnen sammelten den gesamten Urin jeder Fraktion in verschließbaren Polypropylen-Sammelgefäßen mit 1,5 Liter Volumen (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold), die bis zum jeweiligen Fraktionsende gekühlt gelagert wurden. Am Ende jeder Sammelfraktion sollte die Blase komplett entleert werden. Mit einem Messzylinder

wurde das gesamte Urinvolumen der jeweiligen Fraktion bestimmt. Von jeder Urinfraktion wurden fünf Aliquots von ca. 15 ml in Szintillationsgefäße (Neolab, Heidelberg) gefüllt, bei der Studienleitung abgegeben und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Der Rest jeder Urinfraktion wurde verworfen, sodass das Sammelgefäß für die jeweils folgende Urinfraktion genutzt werden konnte.

Zur einfacheren Handhabung für spätere Analysen wurden alle Urinproben in jeweils fünf Reaktionsgefäße (1,5 ml, Eppendorf, Bertzdorf) aliquotiert und bis zur Messung bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Verkürzung des Messzeitraums am Elementaranalysator wurden die einzelnen zwischen 6-24 Stunden nach Aufnahme des ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU gesammelten Urinfraktionen gepoolt. Demnach wurden die Gehalte an C, ^{13}C , N und ^{15}N in den Urinfraktionen 0-6, 6-24 und 24-30 Stunden bestimmt.

3.1.6.3 Stuhlproben

Die Probandinnen wurden angewiesen, direkt nach dem Stuhlgang mit dem Probenlöffel ein möglichst großes Volumen des frischen Stuhls in zwei der ausgehändigten Stuhlröhrchen mit Schraubverschluss (Sarstedt, Nürnberg) zu füllen. Anschließend sollten die Röhrchen sofort fest verschlossen werden. Bis zur Abgabe bei der Studienleitung und späteren Analyse wurde eines der beiden Röhrchen tiefgefroren (ca. -20 °C) und das andere im Kühlschrank (ca. 2-8 °C) aufbewahrt. Die tiefgefrorenen Stuhlproben dienten zur Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren, des pH-Wertes und der Trockenmasse, während die gekühlten Proben zur mikrobiologischen Untersuchung (Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, Prof. Domann) und zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl verwendet wurden.

3.2 Humanstudie II

In Humanstudie II sollte der „kurzfristige“ Effekt der Testgetränke mit unterschiedlichem Anthocyan- und Ballaststoffgehalt auf mikrobielle Fermentationsprozesse im Colon des Menschen mit ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU untersucht werden. Sie wurde im Rahmen einer Bioverfügbarkeitsstudie zu Anthocyanen durchgeführt und konnte aufgrund des Studiendesigns gleichzeitig zur Untersuchung möglicher „kurzfristiger Effekte“ der Testgetränke aus Humanstudie I auf die intestinale Mikrobiota und für weitere Informationen zur *in vivo*-Metabolisierung von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU genutzt werden. Da keine Stuhlprobensammlung und p-Kresol-Bestimmung im Urin vorgesehen war, beschränkten sich die Daten auf die $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung und die C, ^{13}C , N und ^{15}N -Ausscheidung im Urin. Die Studie wurde vor Beginn von der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-

Liebig-Universität Gießen auf deren Unbedenklichkeit geprüft und genehmigt (Vorlage-Nr. 31/10).

3.2.1 Testgetränke und ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU

Im Rahmen der Humanstudie II dienten der anthocyan- und ballaststoffreiche **Traube-Heidelbeer-Smoothie** und der anthocyanreiche und ballaststoffarme **Traube-Heidelbeer-Saft** als Testgetränke (Abschnitt 3.1.1). Die ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU Trinklösung wurde wie in Humanstudie I hergestellt (Abschnitt 3.1.2).

3.2.2 Studienteilnehmer

An der Studie nahmen 5 weibliche und 5 männliche Personen im Alter von 23-27 Jahren teil. Sie wurden über den Inhalt und Ablauf der Studie sowie mögliche Risiken aufgeklärt. Voraussetzung für eine Teilnahme war die Abgabe einer schriftlichen Einverständniserklärung. Alle Probandinnen und Probanden waren zu Interventionsbeginn gesund und hatten in den letzten 3 der Untersuchung vorausgehenden Monaten weder Vitaminpräparate noch Medikamente eingenommen.

3.2.3 Studiendesign

Es wurde eine randomisierte Doppelblind-Studie durchgeführt. Eine Versuchsperiode umfasste 8 Tage. Während 7 Tagen vor Beginn des Tests und am Messtag unterlagen die Probanden den Ernährungseinschränkungen wie in Humanstudie I (Abschnitt 3.1.4), d.h., es durften weder anthocyan-, polyphenol- und ballaststoffreiche Lebensmittel noch pro- und präbiotische Lebensmittel eingenommen werden (Anhang A-2).

3.2.4 Messtag

Nach der Gewinnung einer Urin- und Atemgasprobe zur Bestimmung der Nüchternwerte erhielten die Probandinnen und Probanden am Messtag (Tag 8) je 330 ml des Testgetränkes zusammen mit 500 mg ^{13}C -LU und 75 mg ^{15}N -LU als Trinklösung oral verabreicht.

Nach Aufnahme des Testgetränkes und von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU wurden über einen Zeitraum von 30 Stunden Atemgasproben zu folgenden Zeitpunkten gesammelt:

- Direkt **vor** Aufnahme von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU (Basiswert)
- **Nach** Aufnahme von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU:
 - o Stündlich bis 15 Stunden
 - o Nach 24 Stunden
 - o Stündlich zwischen 24-30 Stunden

Urinproben wurden über 24 Stunden in folgenden Fraktionen gesammelt:

- Direkt **vor** Aufnahme von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU (Basiswert)
- **Nach** Aufnahme von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU in den Fraktionen:
 - o 0-3, 3-6, 6-9, 9-12, 12-15, 15-24 Stunden

Jede Probandin und jeder Proband erhielt jeden Saft in zwei getrennten Untersuchungsperioden. Außerdem wurde der „Nüchternstoffwechsel“ von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU ohne gleichzeitige Zufuhr eines Testgetränkes an einem weiteren Messtag untersucht.

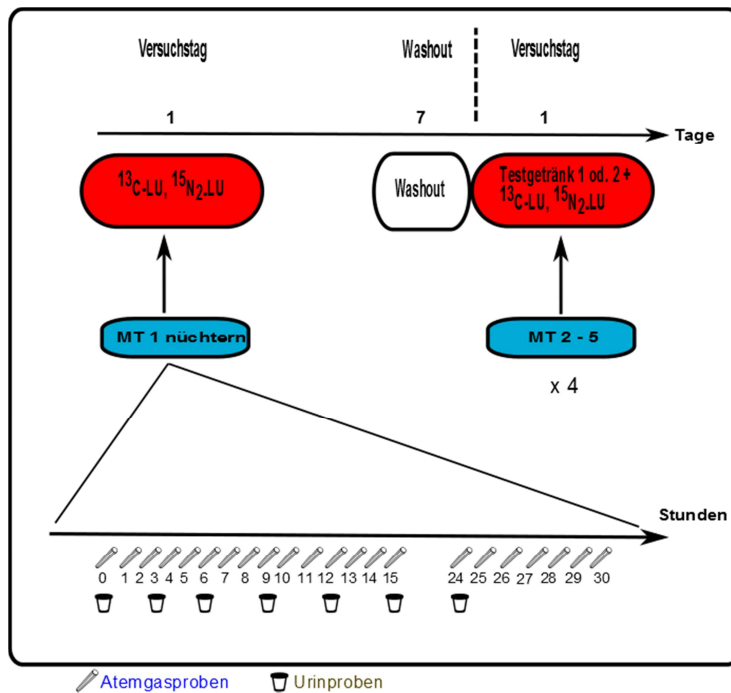


Abb. 3-2 Studiendesign der Humanstudie II (MT = Messtag. Testgetränk 1 = Smoothie, Testgetränk 2 = Saft)

3.2.5 Probenmanagement

Die im Rahmen der Humanstudie II gesammelten Atemgas- und Urinproben wurden wie in Humanstudie I und in Abschnitt 3.1.6.1 und 3.1.6.2 beschrieben, behandelt.

3.3 Analytik

3.3.1 Atemgasproben

Die Bestimmung der ^{13}C -Anreicherung in den Atemgasproben erfolgte über die Analyse des $^{45}\text{CO}_2/^{44}\text{CO}_2$ -Verhältnisses in den Atemgasproben mittels Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (GC/IRMS; Versuchsprinzip siehe Abschnitt 3.3.2. „Versuchsprinzip EA-IRMS“) mit vorgeschalteter Gaschromatographie. Über das Trägergas Helium wurden die Atemgasproben gaschromatographisch aufgetrennt und anschließend die Massen 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$; $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$) und 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$, $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O}$) im IRMS

detektiert. Die Berechnungen zum Ausschluss der seltenen Sauerstoffisotope (Craig-Correction; Craig, 1957) erfolgten durch Gerätesoftware. Das resultierende Isotopenverhältnis wird als Verhältnis des schweren zum leichten Isotop ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) ausgedrückt und als Deltawert (δ) in Promille (‰) gegenüber dem Referenzstandard vPDB (virtual Pee Dee Belemnite) mit dem Isotopenverhältnis $\delta^{13}\text{C}_{\text{vPDB}} = 0,0112372$ angegeben. Die für jede Messung verwendeten Hausstandards wurden mit Hilfe der IAEA-Standards (International Atomic Energy Agency, Wagramer Strasse 5, A-1400 Vienna, Austria; CH_4 und CH_3) gegen die Referenzen kalibriert.

Das C-Isotopenverhältnis ist definiert als:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{vPDB}}[\text{‰}] = \frac{{}^{13}\text{R}_{\text{Sa}} - {}^{13}\text{R}_{\text{vPDB}}}{{}^{13}\text{R}_{\text{vPDB}}} \times 1000$$

Bedeutung der Symbole:

13: C-Isotop mit der Masse 13

R_{sa} : $^{13}\text{C}/(^{12}\text{C} + ^{13}\text{C})$ in der Probe

R_{vPDB} : $^{13}\text{C}/(^{12}\text{C} + ^{13}\text{C})$ in der Referenz (0,0112372)

Geräte und Hilfsmittel

- GC (Microgas GC, GV Instruments, Wytenshave UK)
- Helium, Stickstoff und Sauerstoff jeweils $\geq 99,999\%$ (Air Liquide, Düsseldorf und Praxair, Düsseldorf)
- Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (Isoprime, GV Instruments, Wytenshave UK)
- Wasserfreies Kohlendioxid $\geq 99,999\%$ (Air Liquide, Düsseldorf und Praxair, Düsseldorf)

Tab. 3-2 Bedingungen der gaschromatographischen Trennung zur Bestimmung des $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ -Verhältnisses in Atemgasproben

Säule GC	GVi μgas
Trärgas	Helium
Trärgasdruck	26 psi
Flussrate Probe (Sample flush) (He)	3 psi
Ofentemperatur (GC) pre/post	100/80 °C
Analysenzeit	330 sec

Die $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgasanalysen wurden hinsichtlich des Zeitpunkts der maximalen $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas nach Aufnahme von ^{13}C -LU an den einzelnen Messtagen ausgewertet.

3.3.2 Urinproben

3.3.2.1 C und N, ^{13}C und ^{15}N

C und N

Die Bestimmung der renalen C- und N-Ausscheidung in den gesammelten Urinfraktionen erfolgte mittels Elementaranalyse, gaschromatographischer Trennung der Verbrennungsgase und deren Detektion am Wärmeleitfähigkeitsdetektor. Zur Bestimmung des ^{13}C - und ^{15}N -Gehalts in den Urinproben wurden die Massen der Verbrennungsgase quantitativ im Massenspektrometer, das an den Elementaranalysator (EA) gekoppelt war, detektiert.

Versuchsprinzip für die Elementaranalyse und das Isotopenverhältnis im Massenspektrometer (EA – IRMS)

Die Elementaranalyse ist eine Verbrennungsanalyse, die zur Untersuchung der Zusammensetzung einer Probe bezüglich ihrer Kohlenstoff- und Stickstoffanteile genutzt werden kann. Hierbei wird in einer Heliumatmosphäre die in Zinnkartuschen eingewogene Probe in einem Oxidationsreaktor, gefüllt mit katalytisch aktiven Metallverbindungen, bei ca. 1030 °C verbrannt. Kohlenstoff wird unter Sauerstoffzugabe vollständig zu CO_2 , Stickstoff zu verschiedenen Stickoxiden (NO_x) oxidiert. Die Verbrennungsgase werden anschließend über das Trägergas Helium zum Reduktionsreaktor geleitet, der elementares Cu enthält. Hier werden bei ca. 650 °C die Stickoxide NO_x vollständig zu elementarem Stickstoff N_2 reduziert. In der darauf folgenden Wasserfalle wird Wasser mit Hilfe von $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ gebunden. Die Verbrennungsgase CO_2 und N_2 werden in einer gaschromatographischen Säule von Oxidationsprodukten weiterer Urinbestandteile (z.B. Schwefel) gereinigt und aufgetrennt. Anschließend wird mittels Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD) der C- und N- Gehalt der Probe quantitativ gegen eine Eichreihe bestimmt (Abb. 3-2).

Zur Bestimmung des Isotopenverhältnisses von $^{13}\text{C}/(^{12}\text{C} + ^{13}\text{C})$ und $^{15}\text{N}/(^{14}\text{N} + ^{15}\text{N})$ in der Probe folgt die weitere Analyse eines Aliquots der Verbrennungsgase im Anschluss an den TCD im Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (IRMS). Im IR-Massenspektrometer werden die Gasmoleküle in einem Elektron-Emissionsstrom ionisiert und durch ein angelegtes elektrisches Feld in einem Flugrohr beschleunigt. Beim Durchlaufen eines Magnetfeldes werden die Ionen aufgrund verschiedener Massen unterschiedlich stark abgelenkt, bevor sie auf Ionenkollektoren treffen, die die Anzahl der verschiedenen Ionen registrieren (Abb. 3-3).

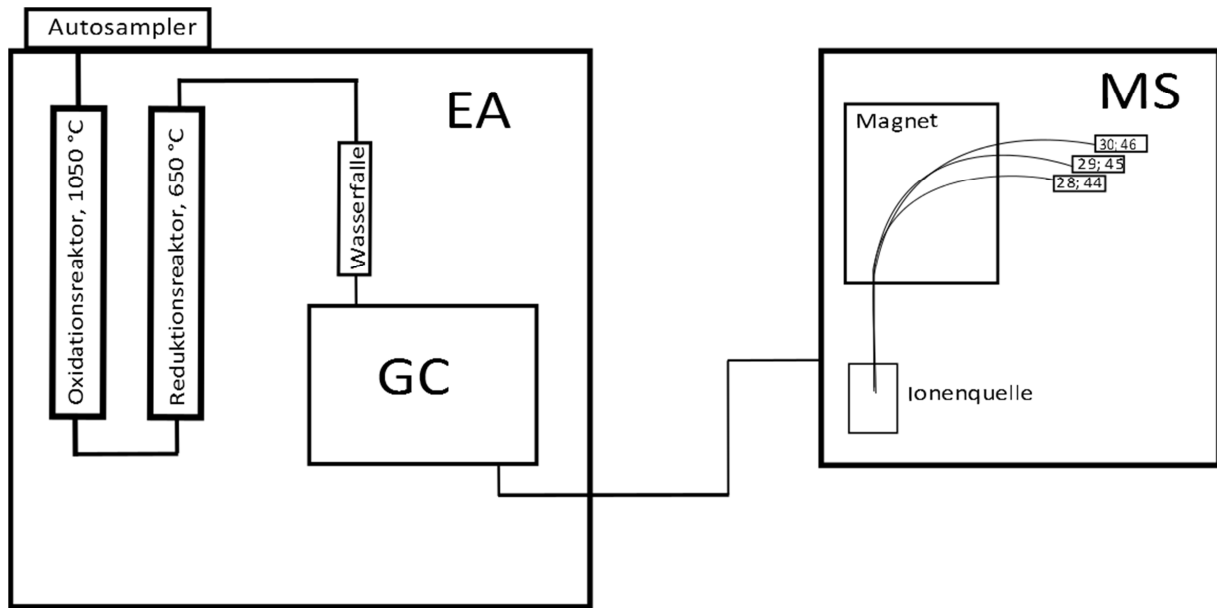


Abb. 3-3 Schematische Darstellung eines Elementaranalysators gekoppelt an ein Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (EA-IRMS): Über den Autosampler wird die Probe in den Elementaranalysator (EA) aufgegeben und im Oxidationsreaktor verbrannt. Die Verbrennungsgase passieren anschließend den Reduktionsreaktor und die Wasserfalle, bevor sie im Gaschromatographen (GC) aufgetrennt werden. Über einen Split wird dann ein Aliquot in das Massenspektrometer geleitet, wo für C die Massen 44, 45 und 46 und für N die Massen 28, 29 und 30 detektiert werden.

Das C-Isotopenverhältnis in den Verbrennungsgasen der Urinproben wurde wie bei den Atemgasproben (siehe Abschnitt 3.2.1 „Atemgasproben“) bestimmt und berechnet. Analog dazu erfolgte zur Bestimmung des N-Isotopenverhältnisses die Detektion der Massen 28 ($^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$), 29 ($^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$) und 30 ($^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$) im IRMS. Für das N-Isotopenverhältnis diente atmosphärischer Stickstoff mit $\delta^{15}\text{N}_{\text{Luft}} = 0,0036765$ als Referenzstandard. Die für jede Messung verwendeten Hausstandards wurden mit Hilfe der IAEA-Standards (International Atomic Energy Agency, Wagramer Strasse 5, A-1400 Vienna, Austria; CH_6 und CH_3 bzw. 310 und 311) gegen die Referenzen kalibriert.

Das N-Isotopenverhältnis wurde folgendermaßen berechnet:

$$\delta^{15}N_{Luft}[\text{‰}] = \frac{{}^{15}R_{Sa} - {}^{15}R_{Luft}}{{}^{15}R_{Luft}} \times 1000$$

Bedeutung der Symbole:

15: N-Isotop mit der Masse 15

R_{sa} : ${}^{15}N/({}^{14}N + {}^{15}N)$ in der Probe

R_{vPDB} : ${}^{15}N/({}^{14}N + {}^{15}N)$ in der Referenz (0,0036765)

Reagenzien

- Chromosorb (Hekatech, Wegberg)
- Harnstoff (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Magnesiumperchlorat (Hekatech, Wegberg)

Geräte und Hilfsmittel

- Analysenwaage BP 211 D (Sartorius, Göttingen)
- Eurovector EA (Hekatech GmbH, Wegberg)
- Helium, Stickstoff und Sauerstoff jeweils $\geq 99,999\%$ (Air Liquide, Düsseldorf und Praxair, Düsseldorf)
- Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (Isoprime, GV Instruments, Wytenshave UK)
- Pipetten (Eppendorf, Bertzdorf)
- Verschließsystem mit Platte $\varnothing 5\text{ mm}$ (Hekatech GmbH, Wegberg)
- Verschließwerkzeug (Hekatech GmbH, Wegberg)
- Wasserfreies Kohlendioxid $\geq 99,999\%$ (Air Liquide, Düsseldorf und Praxair, Düsseldorf)
- Zinnkartuschen für Feststoffe 5 x 9 mm (Hekatech GmbH, Wegberg)

Versuchsdurchführung

Die Urinproben wurden schonend bei ca. 8 °C aufgetaut. Als Adsorbent für die flüssigen Urinproben wurden anschließend 5-7 mg Chromosorb mit dem Spatel in eine Zinnkapsel eingewogen und 15-20 µl der Urinprobe hinzupipettiert. Das genaue Gewicht der Einwaage wurde notiert, die Kapsel mit dem Verschließwerkzeug und der Pinzette fest verschlossen und anschließend der C- und N-Gehalt mittels Elementaranalyse bestimmt (Tab. 3-3).

Tab. 3-3 Bedingungen der Elementaranalyse und gaschromatographischen Trennung zur Bestimmung des C- und N-Gehalts und der ^{13}C - und ^{15}N -Anreicherung in Urinproben

Gerät	Eurovector EA mit IRMS (^{13}C - und ^{15}N -Bestimmung)
Trärgas	Helium
Trärgasdruck	41 kPa
Flussrate Trärgas	90 ml/min
Oxidationsreaktor	Chromoxid, Wolframoxid, Hekatech, 1030 °C
Oxidationsmittel	Sauerstoff
Reduktionsreaktor	Kupfer, Hekatech, 650 °C
Wasserfalle	Magnesiumperchlorat
Säule GC (EA)	Hekatech
Ofentemperatur (GC)	80 °C
Detektor	Wärmeleitfähigkeitsdetektor
Analysenzeit C und N	330 sec
Analysenzeit ^{13}C und ^{15}N	350 sec

Die Bestimmung des C- und N-Gehalts in den Urinproben erfolgte in Dreifachbestimmung anhand der Fläche unter der Kurve mittels Eichgerade. Zur Erstellung der Eichgeraden diente Harnstoff als Standard, wobei der C- und N-Gehalt (X-Achse) gegenüber der Peakfläche (Y-Achse) aufgetragen wurde. Über die Geradengleichungen der Ausgleichsgerade konnte der prozentuale C- und N-Gehalt der Urinproben folgendermaßen berechnet werden:

$$\text{Stickstoff: } y = 270087 x + 666,920 \quad \rightarrow x = 100 \times \frac{(y-666,92)}{270087}$$

$$\text{Stickstoff [\%]} = \frac{100}{\text{Einwaage Probe (mg)}} \times \frac{(y-666,92)}{270087}$$

$$\text{Kohlenstoff: } y = 758173 x + 1503 \quad \rightarrow x = 100 \times \frac{(y-1503)}{758173}$$

$$\text{Kohlenstoff [\%]} = \frac{100}{\text{Einwaage Probe (mg)}} \times \frac{(y-1503)}{758173}$$

Bedeutung der Symbole:

y: Fläche unter der Kurve für C bzw. N

x: C bzw. N in mg

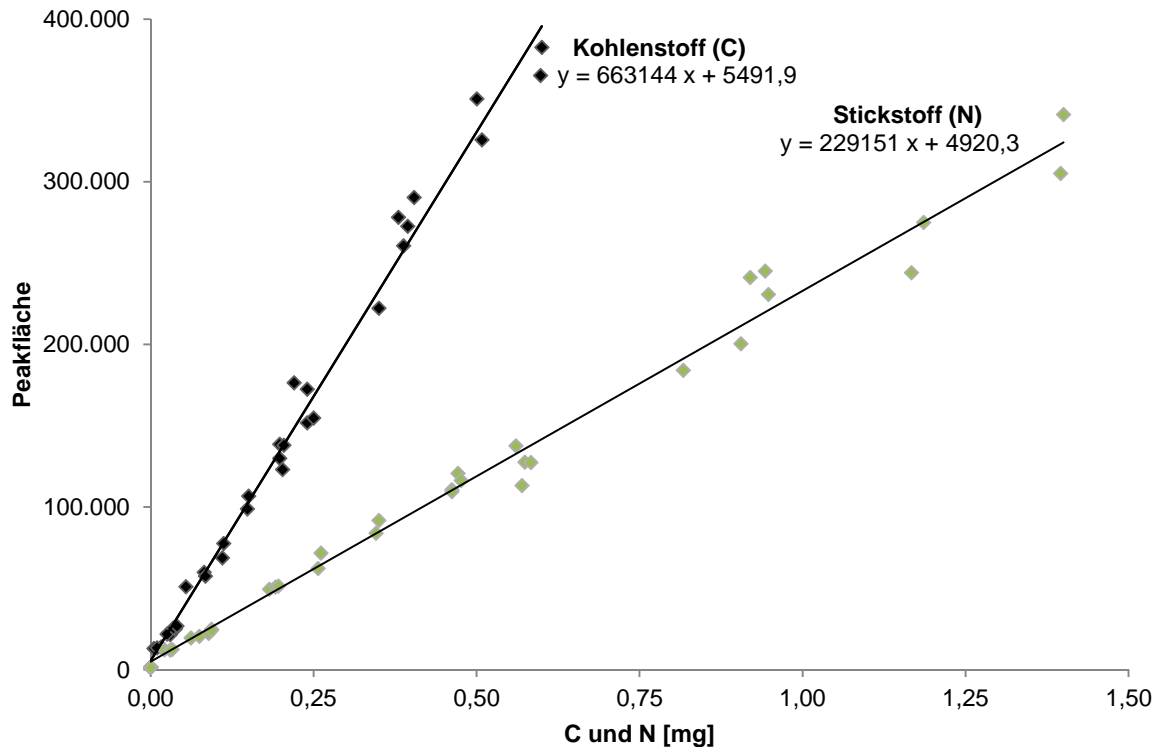


Abb. 3-4 Eichgerade für C und N in Harnstoff am Elementaranalysator

Der Korrelationskoeffizient der Eichgeraden lag für C bei 0,997 und für N bei 0,998. Damit wurde die Messung als hinreichend genau angenommen.

¹³C und ¹⁵N

Die Bestimmung des ¹³C- und ¹⁵N-Gehalts in den Urinproben erfolgte analog zur C- und N-Bestimmung mittels Elementaranalyse und angeschlossenen Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (Tab. 3-3). Die Urinproben wurden behandelt wie in Abschnitt 3.2.2.1 beschrieben, mit dem Unterschied, dass nur 1-2 mg Chromosorb und 2-3 µl der Urinproben eingewogen wurden und die Detektion der Massen 44, 45 und 46 für CO₂ und die Massen 28, 29 und 30 für N₂ im Massenspektrometer erfolgte.

Berechnungen

Über den jeweils bestimmten Delta-Wert wurde das ¹³C/(¹²C+¹³C)-Verhältnis in den Urinproben zum Referenzstandard $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ und das ¹⁵N/(¹⁴N+¹⁵N)-Verhältnis zum Referenzstandard $\delta^{15}\text{N}_{\text{Luft}}$ berechnet. Die basale ¹³C- und ¹⁵N-Ausscheidung im Urin wurde an jedem Messtag für jede Probandin in der Urinprobe vor Einnahme von ¹³C-LU und ¹⁵N₂-LU bestimmt. Alle folgenden Urinproben wurden jeweils um diesen Wert bereinigt.

Die absolute renale ^{13}C -Exkretion errechnete sich aus folgenden Formeln:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{vPDB}}[\text{‰}] = \frac{{}^{13}\text{R}_{\text{sa}} - {}^{13}\text{R}_{\text{vPDB}}}{{}^{13}\text{R}_{\text{vPDB}}} \times 1000$$

$$\rightarrow {}^{13}\text{R}_{\text{sa}} = \left(\left(\frac{\delta_{\text{sa}} \times {}^{13}\text{R}_{\text{vPDB}}}{1000} \right) + {}^{13}\text{R}_{\text{vPDB}} \right) - \left(\left(\frac{\delta_{\text{basis}} \times {}^{13}\text{R}_{\text{vPDB}}}{1000} \right) + {}^{13}\text{R}_{\text{vPDB}} \right)$$

$${}^{13}\text{C} [\text{mg}] = \text{R}_{\text{sa}} \times \text{C} [\%] \times \text{Urinvolumen} [\text{L}] \times 10000$$

Bedeutung der Symbole:

C [%]: prozentualer C-Gehalt Probe

δ_{sa} : Isotopenverhältnis Probe

δ_{basis} : Isotopenverhältnis Basiswert Urinprobe

R_{sa} : $^{13}\text{C}/(^{12}\text{C} + ^{13}\text{C})$ Probe

R_{vPDB} : $^{13}\text{C}/(^{12}\text{C} + ^{13}\text{C})$ vPDB $\rightarrow \delta^{13}\text{C}_{\text{vPDB}} = 0,0112372$

Die absolute renale ^{15}N -Exkretion errechnete sich nach folgender Formel:

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{Luft}}[\text{‰}] = \frac{{}^{15}\text{R}_{\text{sa}} - {}^{15}\text{R}_{\text{Luft}}}{{}^{15}\text{R}_{\text{Luft}}} \times 1000$$

$$\rightarrow {}^{15}\text{R}_{\text{sa}} = \left(\left(\frac{\delta_{\text{sa}} \times {}^{15}\text{R}_{\text{Luft}}}{1000} \right) + {}^{15}\text{R}_{\text{Luft}} \right) - \left(\left(\frac{\delta_{\text{basis}} \times {}^{15}\text{R}_{\text{Luft}}}{1000} \right) + {}^{15}\text{R}_{\text{Luft}} \right)$$

$${}^{15}\text{N} [\text{mg}] = \text{R}_{\text{s}} \times \text{N} [\%] \times \text{Urinvolumen} [\text{L}] \times 10000$$

Bedeutung der Symbole:

δ_{sa} : Deltawert Probe

δ_{basis} : Deltawert Basiswert Urinprobe

N [%]: prozentualer N-Gehalt Probe

R_{sa} : $^{15}\text{N}/(^{14}\text{N} + ^{15}\text{N})$ Probe

R_{Luft} : $^{15}\text{N}/(^{14}\text{N} + ^{15}\text{N})$ Luft $\rightarrow \delta^{15}\text{N}_{\text{Luft}} = 0,0036765$

Zur Berechnung der prozentualen Ausscheidung im Urin wurden die in Urinproben vorhandenen absoluten Mengen der Isotope in Beziehung zur absolut verabreichten Menge des Isotops in Form von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU gesetzt:

$$\text{X} [\%] = \frac{\text{Menge der prozentualen,renalen Exkretion } ^{13}\text{C}/^{15}\text{N}[\text{mg}]}{\text{Verabreichte Dosis } ^{13}\text{C}/^{15}\text{N}[\text{mg}]} \times 100$$

3.3.2.2 p-Kresol

Die Bestimmung von p-Kresol in den Urinproben erfolgte mittels gekoppelter Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS).

Reagenzien

- Wasser, CHROMASOLV Plus, HPLC Grad (Sigma und Aldrich GmbH, (Fluka), Steinheim)
- Essigsäureethylester $\geq 99\%$, LC-MS Grad (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Natriumsulfat, wasserfrei $\geq 99\%$ p.a., ACS, gekörnt (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Schwefelsäure 98 %, (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Geräte und Hilfsmittel

- Alufolie
- Bechergläser, Glas
- GC (Agilent 6890N) mit MSD (Agilent 5973)
- Glas-Vials 2 ml, clear standard opening (8 mm) screw top vials (Agilent Technologies, Waldbronn)
- Laborwaage (Sartorius, Göttingen)
- Pipetten (Eppendorf, Bertzdorf)
- Reaktionsgefäße, 2 ml, Safe-Lock-Tubes (Eppendorf, Bertzdorf)
- Reax top Vortexer (Heidolph Instruments, Schwabach)
- Thermomixer kompakt (Eppendorf, Bertzdorf)
- TPX Kurzgewindeflasche 32 x 11,6 mm mit integriertem 0,2 ml Glas-Mikroeinsatz, 15 mm Spitze (IVA Analystechnik e.K., Meerbusch/Düsseldorf)
- TPX Kurzgewindeschraubkappe, 9 mm PP, transparent mit Loch, Silikon weiß/PTFE rot, 55° shore A, 1,0 mm (IVA Analystechnik e.K., Meerbusch/Düsseldorf)
- Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen)

Versuchsdurchführung

Die Urinproben wurden zunächst schonend im Kühlschrank aufgetaut und anschließend 425 μ l Urin in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Zur Deproteinierung und Hydrolysierung konjugierter Phenole wurden 50 μ l Schwefelsäure hinzugegeben und die Probe für 30 min bei 90 °C im mit Alufolie abgedeckten Thermomixer inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Probe zum Ausschütteln des p-Kresols mit 150 μ l Ethylacetat versetzt und für ca. 10 Sekunden mit dem Vortex-Rüttler durchmischt. Zur Phasentrennung folgte ein Zentrifugationsschritt für 20 min bei 21 °C und 1550 x g. Währenddessen wurde ein gehäufte Mikrolöffel Natriumsulfat in ein Glas-Vial gegeben. Nach der Zentrifugation wurden 100 μ l Überstand (oberste Schicht – Ethylacetat) abgenommen und zum Trocknen in das Glas-Vial mit Natriumsulfat pipettiert. Nach der Trocknung wurden ca. 40 μ l der Probenlösung in eine TPX-Kurzgewindeflasche überführt und mittels GC/MS analysiert.

Nicht sofort gemessene Proben wurden tiefgekühlt bei -20 °C zwischengelagert. Tabelle 3.4 zeigt die verwendeten GC/MS-Bedingungen.

Tab. 3-4 GC/MS – Bedingungen zur Bestimmung von p-Kresol in Urinproben

Gerät	GC (Agilent 6890N) mit MSD (Agilent 5973)
Säule	DB-5MS, (Durchmesser: 0,25 mm; Länge: 30 m; Filmdicke: 0,25 µm) (Agilent Technologies, Waldbronn)
Trärgas/Flussrate	Helium/1 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl (10 µl Spritzen Gold/Teflon (Agilent Technologies, Waldbronn))
Injektionstemperatur	250 °C
Verdünnung/Split	Helium Verdünnungsfaktor 5:1 Druck: 8,59 psi Splitfluss: 4,9 ml/min Gesamtfluss: 8,4 ml/min
Temperaturprogramm GC	Starttemperatur: 70 °C Temperaturrate 1: 22,5 °C/min Finale Temperatur 1: 175 °C Isotherme 1: 1,17 min Temperaturrate 2: 25 °C/min Finale Temperatur 2: 150 °C Isotherme: 0 min Temperaturrate 3: 30 °C/min Finale Temperatur 3: 70 °C Isotherme 3: 0 min
Analysenzeit GC	10 min
Massenspektrometer	Start: 5,33 min Massenanalysator: Quadropol Ionisation: Electron Impact Scanrate: 0,5 sec/Scan Massenbereich: SIM Modus: m/z 107

Die nach GC/MS ausgegebenen Peakflächen wurden mittels Eichgerade in die p-Kresol-Konzentration (mg/l) in den Urinproben umgerechnet. Zur Erstellung der Eichgeraden wurde p-Kresol in verschiedenen Konzentrationsstufen in Wasser gelöst und mittels GC/MS analysiert. Die Berechnung der p-Kresol-Konzentration erfolgte mit der Software Chemstation, Version D.01.02.16 (Agilent Technologies, Waldbronn).

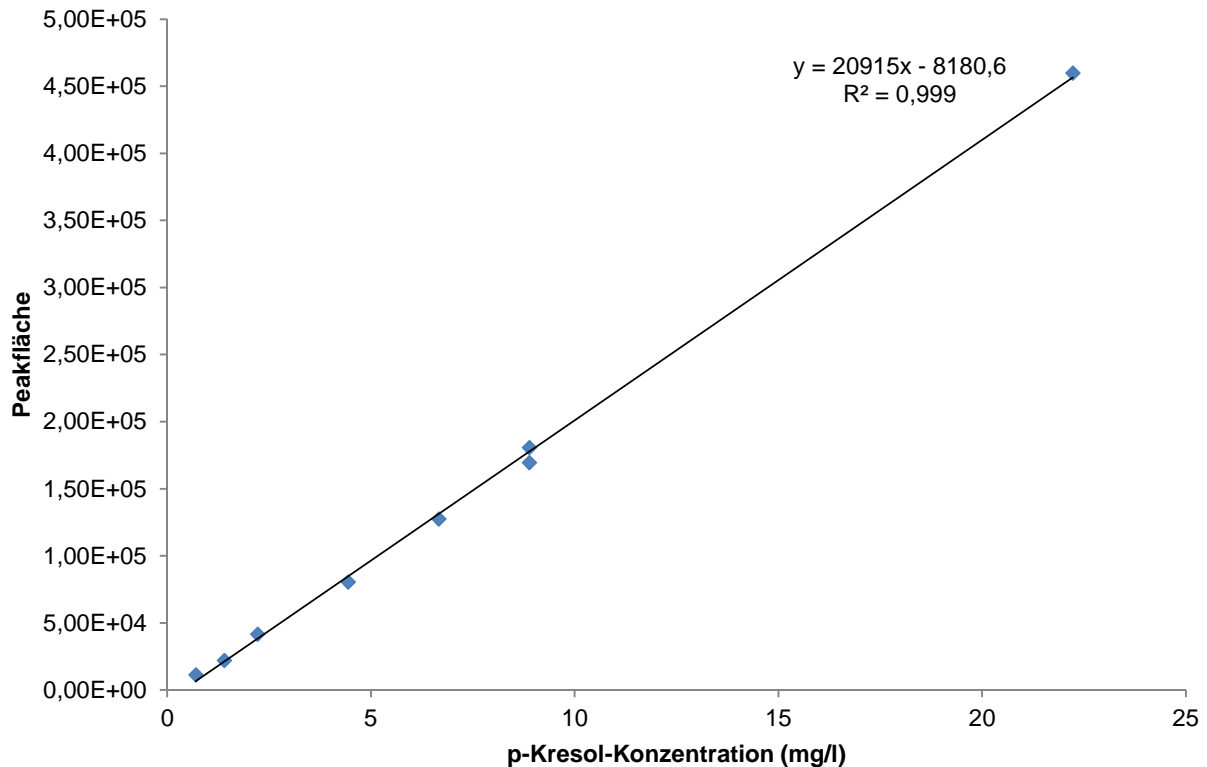


Abb. 3-5 Eichgerade für p-Kresol in Wasser am GC/MS

Der Korrelationskoeffizient der Eichgeraden lag bei 0,999 und wurde als hinreichend genau angenommen. Zur Auswertung wurde die kumulative p-Kresol-Ausscheidung in den 0-6 h, 6-24 h und 24-30 h gesammelten Urinfraktionen berechnet.

3.3.3 Stuhlproben

3.3.3.1 Trockensubstanz

Geräte und Hilfsmittel

- Laborwaage (Sartorius, Göttingen)
- Trockenschrank (Memmert, Schwabach)

Versuchsdurchführung

Zur Bestimmung der Trockensubstanz wurden nach erstem Zentrifugationsschritt die Rückstände der nicht zur Analyse auf kurzkettige Fettsäuren benötigten Stuhlproben (siehe Abschnitt 3.3.3.3) verwendet. Dazu wurden zwischen 0,1-1,8 g (je nach vorhandenem Volumen) der frischen Stuhlprobe im Zentrifugenröhrchen bei 95 °C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und der Rückstand durch Differenzwägung ermittelt.

3.3.3.2 pH-Wert

Geräte und Hilfsmittel

- Labor-pH-Meter inolab Level 1 (WTW, Weilheim)

Versuchsdurchführung

Die Messung des pH-Wertes der Stuhlproben erfolgte in den aufgetauten Stuhlproben vor der Aufarbeitung zur Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren (siehe Abschnitt 3.3.3.3) mit einem Digital-pH-Meter nach vorheriger Eichung.

3.3.3.3 Kurzkettige Fettsäuren

Zur Bestimmung kurzkettiger Fettsäuren wurden alle Stuhlproben nach denselben Verfahren aufgearbeitet. Zur Messung wurden zwei gaschromatographische Methoden mit unterschiedlicher Detektion angewandt. Acetat, Propionat und Butyrat wurden nach gaschromatographischer Auftrennung massenspektrometrisch detektiert (GC/MS). Isobutyrat, Isovalerat und Valerat wurden in getrennten Stuhlproben gaschromatographisch mittels Flammenionisationsdetektor analysiert.

Reagenzien

- 2-Methyl-Valeriansäure (Sigma und Aldrich GmbH, (Fluka), Steinheim)
- Bidestilliertes Wasser
- Chromasolv for HPLC (Sigma und Aldrich GmbH, (Fluka), Steinheim)

Geräte und Hilfsmittel

- GC (Agilent 6890N) mit MSD (Agilent 5973)
- Laborwaage (Sartorius, Göttingen)
- Pipetten (Eppendorf, Bertzdorf)
- Reaktionsgefäße, 2 ml, Safe-Lock-Tubes (Eppendorf, Bertzdorf)
- Reax top Vortexer (Heidolph Instruments, Schwabach)
- Shimadzu GC 14B (Shimadzu Europa, Duisburg)
- TPX Kurzgewindeflasche 32 x 11,6 mm mit integrierter 0,2 ml Glas-Mikroeinsatz, 15 mm Spitze (IVA Analysentechnik e.K., Meerbusch/Düsseldorf)
- TPX Kurzgewindeschraubkappe, 9 mm PP, transparent mit Loch, Silikon weiß/PTFE rot, 55° shore A, 1,0 mm (IVA Analysentechnik e.K., Meerbusch/Düsseldorf)
- Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen)
- Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen mit Schraubverschluss 13 ml, 16 x 100 mm, (Neolab, Heidelberg)

Versuchsdurchführung

Zur Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren wurden die tiefgefrorenen Stuhlproben über Nacht schonend im Kühlschrank aufgetaut. 0,1-1,8 g frischer Stuhl (je nach gesammeltem Volumen) wurden anschließend in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen, das Gewicht notiert und mit dem doppelten Volumen bidestilliertem Wasser versetzt (Verhältnis Stuhl:Wasser = 1:2). Anschließend wurden die Stuhlproben kräftig geschüttelt, 2 min gevortext und für 10 min bei Raumtemperatur und 3900 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben, kräftig geschüttelt, 2 min gevortext und 1-2 ml in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei Raumtemperatur und 10000 x g. Der Überstand wurde anschließend in eine TPX-Kurzwindenflasche pipettiert, diese sofort verschlossen und es folgte die gaschromatographische Trennung und massenspektrometrische Detektion der kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat (siehe Tabelle 3-5). Die Konzentrationsbestimmung dieser kurzkettigen Fettsäuren erfolgte anhand der Fläche unter der Kurve mittels Eichgeraden, wobei der Mittelwert aus drei Messungen je Probe errechnet wurde.

Tab. 3-5 Gaschromatographische und massenspektrometrische Bedingungen zur Bestimmung von Acetat, Propionat und Butyrat in Stuhlproben

Gerät	GC (Agilent 6890N) mit MSD (Agilent 5973)
Säule	HP-Innowax (Durchmesser: 0,25 mm; Länge: 30 m; Filmdicke: 0,25 µm) (Agilent Technologies, Waldbronn)
Trärgas/Flussrate	Helium/1 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl (10 µl Spritzen Gold/Teflon (Agilent Technologies, Waldbronn))
Injektionstemperatur	250 °C
Verdünnung/Split	Helium Verdünnungsfaktor: 1:1 Druck: 7,57 psi Splitfluss: 1 ml/min Gesamtfluss: 4,5 ml/min
Temperaturprogramm GC	Starttemperatur: 70 °C Temperaturrate 1: 15 °C/min Finale Temperatur 1: 95 °C Isotherme 1: 0 min Temperaturrate 2: 12,5 °C/min Finale Temperatur 2: 120 °C Isotherme 2: 0 min Temperaturrate 3: 10 °C/min Finale Temperatur 3: 165 °C Isotherme 3: 0 min Temperaturrate 4: 20 °C/min Finale Temperatur 4: 245 °C Isotherme 4: 0,2 min Temperaturrate 5: 25 °C/min Finale Temperatur 5: 50 °C Isotherme 5: 0 min
Analysenzeit GC	22 min
Massenspektrometer	Start: 9,5 min Massenanalysator: Quadropol Ionisation: Electron Impact Scanrate: Massenbereich: SIM Modus: m/z 40-120

Tabelle 3-6 zeigt die gaschromatographischen Bedingungen zur Bestimmung von Isobutyrat, Isovalerat und Valerat in den Stuhlproben. Die Detektion erfolgte mittels Flammenionisationsdetektor. Die Konzentrationen dieser Fettsäuren wurden durch den Vergleich der Peakflächen eines externen Standardgemisches aus Isobutyrat, Isovalerat und Valerat ermittelt. Zu jeder Messreihe dienten Kalibrierungsanalysen mit den Standards als Referenz.

Das Standardgemisch enthielt pro ml:

Isobutyrat	1 µmol
Isovalerat	2 µmol
Valerat	3 µmol

Jede Probe wurde zweimal analysiert und der Mittelwert beider Messungen in µmol je g Trockenmasse (TM) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration}_{\text{FS, Probe}} [\mu\text{mol/g TM}] = \left(\frac{\text{Area Subst.} \times \mu\text{mol FS. Std.}}{\text{Area Subst.Std.}} \times VF \right) \times \frac{100}{\text{TM} [\%]}$$

Bedeutung der Symbole:

Area:	Peakfläche
Std.:	Standard
FS.:	Substanz (Isobutyrat, Isovalerat, Valerat)
TM:	Trockenmasse
VF:	Verdünnungsfaktor

Tab. 3-6 Gaschromatographische Bedingungen zur Bestimmung von Isobutyrat, Isovalerat und Valerat in Stuhlproben

Gerät	Shimadzu GC 14B (Shimadzu Europa, Duisburg)
Detektor	Flammenionisationsdetektor
Säule	Gepackte Glassäule, 2,1m, Shimadzu (221-143558-21)
Säulenfüllung	10 % Carbowax 20 MTPA SP1000 mit 1 % H ₃ PO ₄ auf Chromosorb WAW, 80/100
Injektionsvolumen	1 µl
Injektionstemperatur	200 °C
Trärgas/Flussrate	Wasserstoff (99,999 %), 100 ml/min (Einstellung: 100 kPa) Das Trärgas wurde gleichzeitig als Brenngas für den FID verwendet.
Säulenofentemperatur	120 °C, isotherm
Detektortemperatur	200 °C
Synthetische Luft	50 kPa
Integrator	Merk D-2000 (Fa. Merk, Darmstadt)

Bei der Berechnung der Gesamtkonzentration kurzkettiger Fettsäuren sowie des prozentualen Anteils einzelner Fettsäuren wurden nur die mengenmäßig dominanten Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat aus der GC/MS Methode einbezogen.

3.3.3.4 Gesamtkeimzahl

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl in den Stuhlproben erfolgte mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Als Ausgangsmaterial dienten die gekühlten (2-8 °C) Stuhlproben (Institut für medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, Prof. Domann), die vor Einnahme von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU an den Messtagen gesammelt wurden.

Versuchsprinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist eine Methode, die eine schnelle und spezifische Identifizierung von Mikroorganismen in ihrer natürlichen Umgebung (in situ) ermöglicht. Dabei dient die rRNA als Zielmolekül und kann über Bindung (Hybridisierung) mit einer künstlichen Sonde, bestehend aus den komplementären Basen zur zu identifizierenden rRNA, nachgewiesen werden. Die Sonde ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der nach Bindung am Zielmolekül fluoresziert und im Fluoreszenzmikroskop oder Durchflusszytometer quantitativ detektiert werden kann. Abbildung 3-6 zeigt den schematischen Ablauf einer FISH. Der Ablauf der FISH lässt sich in mehrere Schritte unterteilen: Zunächst wird das zu untersuchende Probenmaterial fixiert und permeabilisiert. Es folgt die Hybridisierung mit der Sonde zum Nachweis der Zielsequenz, ein Waschschriff zur Entfernung des ungebundenen Probenmaterials und schließlich die Detektion im Fluoreszenzmikroskop oder Durchflusszytometer (Abb. 3-6).

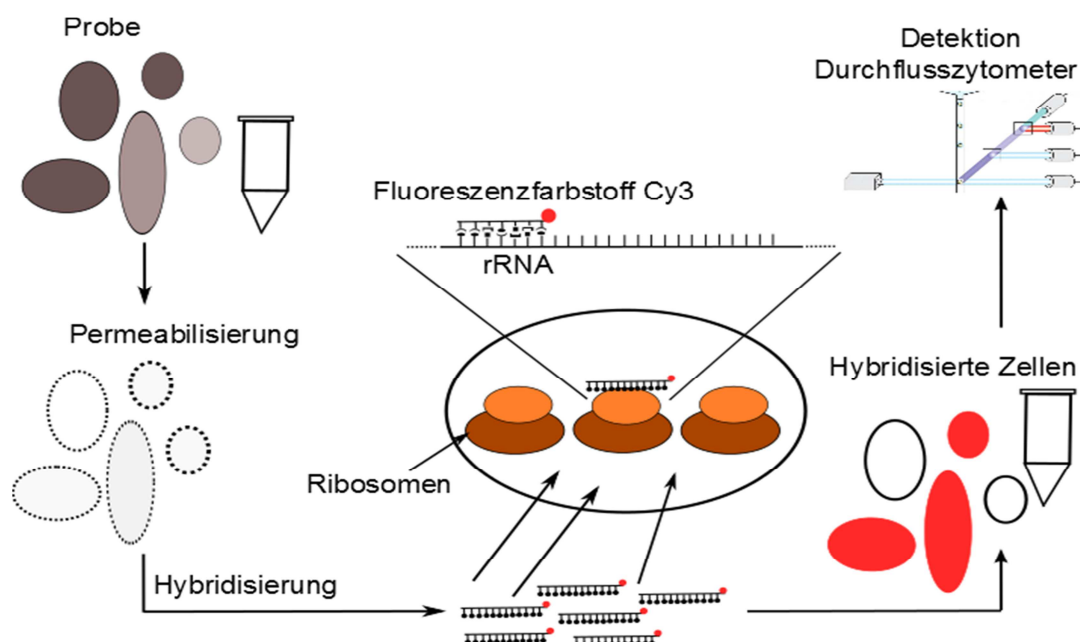


Abb. 3-6 Ablaufschema FISH [modifiziert nach Karlsruher Institut für Technologie, 2014; Janeway *et al.*, 2005]

Reagenzien

- Bidestilliertes Wasser
- Ethanol (100 %)
- Hybridisierungspuffer (laborinterne Zusammensetzung: 20 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 0,9 M NaCl (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), 0,1 % SDS, pH 7,2)
- Lysostaphin (Sigma und Aldrich, GmbH, (Fluka), Steinheim)
- Lysozym (50000 U/mg, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Paraformaldehydlösung (4 %) (100 ml 1 x PBS + 4 mg Paraformaldehyd (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe))
- PBS (laborinterne Zusammensetzung, z.B.: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ in 800 ml destilliertem Wasser, pH auf 7,4 mit HCl einstellen) → 1 x PBS = PBS verdünnt auf 1:10 mit bidestilliertem Wasser
- Waschpuffer (laborinterne Zusammensetzung: 20 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 0,9 M NaCl (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), pH 7,2)

Geräte und Hilfsmittel

- Durchflusszytometer Guava Easy Cyte Mini (Merck Millipore, Billerica)
- MiniSpin®-Zentrifuge (Eppendorf, Bertzdorf)
- Pipetten (Eppendorf, Bertzdorf)
- Reaktionsgefäße, 2 ml, Safe-Lock-Tubes (Eppendorf, Bertzdorf)
- Reax top Vortexer (Heidolph Instruments, Schwabach)
- Thermomixer kompakt (Eppendorf, Bertzdorf)

Oligonukleotidsonde

Die Sonde zur FISH wurde von der Firma Eurogentec Deutschland GmbH (Köln) synthetisiert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indocarbocyanin (Cy3) am 5'-Ende markiert. Es wurde nach Herstellerangaben eine 100 µM Stammlösung der Sonde in sterilem, bidestilliertem Wasser hergestellt und bei -20 °C gelagert.

Tab. 3-7 Daten der verwendeten Oligonukleotidsonde

Sonde	Zielgruppe/-molekül	Basensequenz (5' → 3')	Referenz
EUB 338	<i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Amann <i>et al.</i> , 1990

Versuchsdurchführung

Probenvorbereitung

Es wurde jeweils 1 g frischer Stuhl mit 1 ml bidestilliertem Wasser homogenisiert. Anschließend wurde das Probengemisch für 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Großbestandteile am Boden absetzen zu lassen. Anschließend wurden 500 µl des Überstands abgenommen, in ein 2 ml Eppendorf–Reaktionsgefäß pipettiert und bei -80 °C eingefroren.

Fixierung und Dehydrierung

Zur Fixierung wurde der Überstand der Stuhlproben schonend im Kühlschrank aufgetaut. Für die Paraformaldehydfixierung wurden 25 µl des Überstandes zu 75 µl 4%iger Paraformaldehydlösung in einem neuen 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die fixierte Probe für 5 min bei 12400 x g (13400 rpm MiniSpin®-Zentrifuge, Eppendorf) und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand vorsichtig mit der Pipette abgenommen und verworfen. Zur Dehydrierung der Zellsuspension wurden 100 µl 100%iger Ethanol hinzugegeben, 1-2 sec gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten eine 5-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 12400 x g. Der Überstand wurde erneut abgenommen und verworfen.

Permeabilisierung

Zum Aufschluss der bakteriellen Zellwände wurden 100 µl einer Enzymlösung aus Lysozym (500000 U/ml) und Lysostaphin (100 U/ml) gelöst in 1 x PBS zu jedem Zellpellet gegeben, 1-2 sec gevortext und für 1 h bei 37 °C im Thermoblock bei 500 rpm inkubiert. Anschließend wurde für 5 min bei Raumtemperatur und 12400 x g zentrifugiert, der Überstand entfernt und verworfen. Zum Waschen des Zellpellets wurden 100 µl PBS hinzugegeben, 1-2 sec gevortext und erneut zentrifugiert (s.o.) und der Überstand verworfen.

Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurde eine 20 µM Hybridisierungslösung der fluoreszenzmarkierten Sonde hergestellt. Dazu wurden je Probe 5 µl der Sonden-Stammlösung (100 µM) zu 95 µl des auf 46 °C vorgewärmten Hybridisierungspuffers gegeben und diese 100 µl anschließend zum Zellpellet pipettiert. Es wurde für 1-2 sec gevortext und im Thermoblock über Nacht bei 46 °C, im Dunkeln und 500 rpm inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Waschpuffer hinzugegeben und die hybridisierten Bakterien im Gesamtvolumen (100 µl Hybridisierungslösung + 1 ml Waschpuffer) resuspendiert. Unmittelbar vor der Messung im Durchflusszytometer wurde die Probe erneut für 1-2 sec gevortext.

Auswertung der hybridisierten Proben

Zur Detektion und Quantifizierung der hybridisierten Bakterien in den Stuhlproben wurde die Durchflusszytometrie eingesetzt.

Versuchsprinzip Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie können Einzelzellen in Suspension charakterisiert werden. Dabei passieren die Zellen unter Druck einzeln einen Laserstrahl, welcher je nach Größe und innerer Beschaffenheit der Zellen unterschiedlich stark gestreut wird. Zusätzliche Informationen über die Zellen können durch eine Fluoreszenzmarkierung erlangt werden. In dieser Arbeit wurde als Messgerät ein Guava® Easy Cyte™ Mini der Firma Millipore verwendet. Gemessen wurde die Intensität des Lichtes, welches in Vorwärtsrichtung (forward scatter, FSC) entlang des einfallenden Lichtstrahls streut und ein Maß für die Größe der Zellen ist. Die Detektion der hybridisierten Bakterienzellen mit der fluoreszenzmarkierten Sonde EUB 338 erfolgte im Absorptions- und Emissionsmaximum von Cy3 bei Wellenlängen von 496 nm bzw. 578 nm.

Detektion der Bakterien

Zur Datenauswertung diente die Guava CytoSoft™ Software Version 4.2. Um *Bacteria* von anderen Bestandteilen in den Stuhlproben bei der Detektion unterscheiden zu können, wurden zunächst Bakterien vom Stamm *Lactobacillus lactis* in Reinkultur als Kontrolle und Stuhlproben nach Abschnitt 3.2.3.4 aufgearbeitet und im Durchflusszytometer gemessen. Der Hybridisierungsschritt wurde dabei jeweils einmal mit und einmal ohne Zugabe der fluoreszenzmarkierten Sonde EUB 338-Cy3 durchgeführt. Anhand der Punktdiagramme und zugehörigen Histogramme konnten Bakterien von übrigen Stuhlbestandteilen und „Hintergrundrauschen“ unterschieden und die hybridisierten und fluoreszenzmarkierten Bakterien beim Cy3-Absorptions- und Emissionsmaximum von 496 nm bzw. 578 nm identifiziert und quantifiziert werden (Abb. 3-6). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) lag bei den nicht hybridisierten Proben bei 25 und bei den hybridisierten Proben bei 70. Für die Auswertung wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und Trockenmasseanteils die Gesamtkeimzahl je Gramm Trockenmasse Stuhl berechnet und dargestellt.

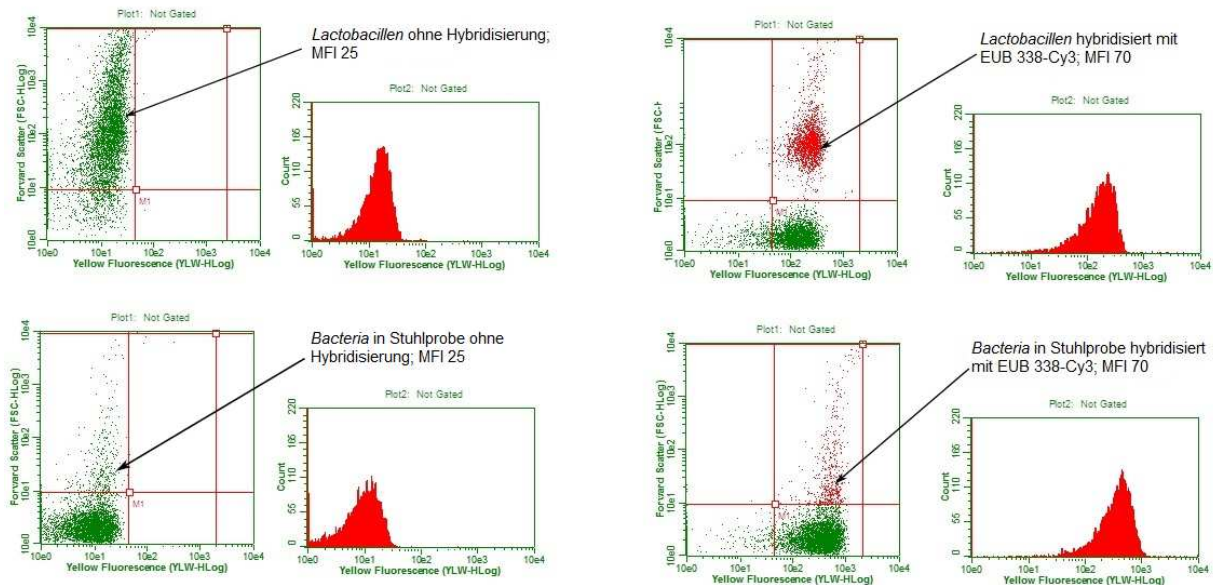


Abb. 3-7 Auswertungsbeispiel am Durchflusszytometer: *Lactobacillus* in Reinkultur und *Bacteria* in Stuhlproben aufgearbeitet nach 3.3.3.4 mit und ohne Hybridisierung mit der Sonde EUB 338-Cy3

3.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte nur für Daten aus Humanstudie I mittels SPSS Vs. 20 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Die Daten der Urin- und Stuhlparameter an den Messtagen vor den Interventionsabschnitten (MT 1, MT 3, MT 5) wurden mittels nicht-parametrischer Varianzanalyse nach Friedman auf Unterschiede durch Testgetränke geprüft. Waren keine Unterschiede gegeben, wurde die Differenz jedes Parameters aus den Werten vor und nach den Interventionsabschnitten gebildet und nach Friedman auf Unterschiede zwischen den Testgetränken geprüft. Ob es eine Zu- oder Abnahme gab, wurde innerhalb jedes Testgetränkes mittels Wilcoxon Test getestet. Mögliche Reihenfolge-Effekte der Testgetränkezufuhr (Carryover-Effekt) wurden in einem allgemeinen linearen Modell geprüft. Als Signifikanzniveau wurde für alle Ergebnisse $P < 0,05$ zugrunde gelegt. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde Microsoft® Office Excel 2010 und die Software GraphPad Prism, Version 5.0 verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Humanstudie I

In einer Interventionsstudie sollte der Effekt eines anthocyanreichen Saftes (SA), eines anthocyan- und ballaststoffreichen Smoothies (SM) und eines Placebogetränkes mit geringem Anthocyan- und Ballaststoffgehalt (PL) auf mikrobielle Aktivitäten im Colon untersucht werden. Dazu wurden ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU eingesetzt, um mikrobielle Stoffwechselprodukte in Urin- und Stuhlproben und die Gesamtkeimzahl der Mikroorganismen in Stuhlproben zu bestimmen. Die Untersuchungen gliederten sich in drei 14-tägige Interventionsabschnitte (IV) mit jeweils vorgeschalteten 10-tägigen Washoutabschnitten (WO) (siehe Studiendesign Humanstudie I Seite 32, Abb. 3-1).

4.1.1 Auswertung und Darstellung der Daten der Humanstudie I

Die Atemgas- und Urinprobensammlung fand am ersten Messtag über 24 h statt. Ab dem zweiten Messtag wurden Atemgasproben über 36 und Urinproben über 30 Stunden nach Aufnahme von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU gesammelt. Eine Ausnahme stellten zwei Probandinnen dar, die erst ab dem dritten bzw. vierten Messtag der Studie beitraten und so an jedem Messtag über 36 Stunden Atemgas- und über 30 Stunden Urinproben sammelten. Aufgrund des randomisierten Studiendesigns lagen daher für jede Interventionsart Daten ab 24 Stunden nur für 22 Probandinnen vor (Die Messtage „vor Smoothie“, „vor Saft“ und „vor Placebo“ waren jeweils für 8 Probandinnen der erste Messtag). Die statistische Auswertung (siehe Abschnitt 3.4) erfolgte für die kumulative ^{13}C -, ^{15}N - und p-Kresol-Ausscheidung im Urin sowie für die Gesamtkeimzahl, den pH-Wert und die Konzentration kurzkettiger Fettsäuren in Stuhlproben der Probandinnen. Dabei wurde auf Unterschiede zwischen den Differenzen vor und nach jeweiliger Interventionsphase (P-I) sowie auf Unterschiede zwischen den Interventionsarten (I-A; „Smoothie“, „Saft“ oder „Placebo“) getestet.

Zur Darstellung des Zeitpunktes der maximalen $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Probandinnen ermittelt.

Für die Daten der Urin- und Stuhlparameter werden Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Messtage vor und nach 14-tägiger Zufuhr der Testgetränke gezeigt. Die Veränderungen der Ausscheidungen der einzelnen Parameter werden außerdem in Boxplot-Diagrammen als Differenzen der Werte vor und nach der jeweiligen Intervention mit den Testgetränken Smoothie, Saft und Placebo dargestellt. „Ausreißer“ sind dabei definiert als diejenigen Werte, die um mehr als das 1,5-fache des Interquartilsabstandes unter dem 25 % oder über dem 75 % Interquartil liegen. Außerdem sind die individuellen Verläufe der Probandinnen zu den Daten der Urin- und Stuhlparameter aufgeführt.

4.1.2 $^{13}\text{CO}_2$ in Atemgasproben

Die Messung der $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas nach oraler Aufnahme von ^{13}C -LU diente zur Beurteilung der bakteriellen Fermentationsaktivität im Colon. T_{\max} spiegelte dabei den Zeitpunkt der maximalen $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas wider.

Die mittlere T_{\max} der $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung der Probandinnen lag an allen Versuchstagen zwischen ca. 15 und 17 Stunden nach Aufnahme von ^{13}C -LU und scheint demnach weder von der Intervention (Vergleich Vor ↔ Nach) noch von der Interventionsart (Vergleich zwischen Testgetränken) beeinflusst worden zu sein (Tab. 4-1).

Tab. 4-1 Zeitpunkt (h:min) der maximalen $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung (T_{\max}) im Atemgas der Probandinnen aus Humanstudie I nach Aufnahme von ^{13}C -LU an den Messtagen vor und nach der Intervention (MW \pm SD, n = 29)

Durchgang I		Durchgang II		Durchgang III	
Vor ¹ SM ²	Nach SM	Vor SA	Nach SA	Vor PL	Nach PL
15:05	17:17	15:11	16:47	17:08	15:47
$\pm 06:14$	$\pm 06:00$	$\pm 05:22$	$\pm 06:24$	$\pm 05:49$	$\pm 04:09$

¹ „Vor“ = Messtage vor der Intervention, „Nach“ = Messtage nach der Intervention

² SM = Smoothie, SA = Saft, PL = Placebo

Bei den $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofilen der Probandinnen bestanden große individuelle Unterschiede. Jedoch waren auch hier im Mittel keine Einflüsse der 14-tägigen Interventionen bei Vergleichen „Vor ↔ Nach“ bzw. zwischen den Testgetränken Smoothie, Saft oder Placebo erkennbar (Abb. 4-1). Die individuellen Atemgaszeitprofile der 30 Probandinnen an den Messtagen sind im Anhang A 4 aufgeführt.

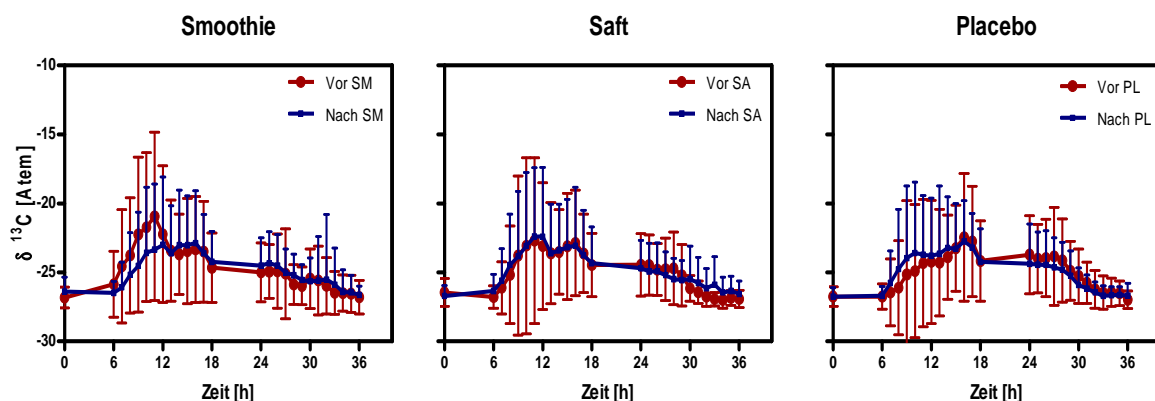


Abb. 4-1 $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofile der Probandinnen aus Humanstudie I nach Aufnahme von ^{13}C -LU (500 mg) an den Messtagen vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) oder Placebo (PL) (MW \pm SD der Zeitpunkte der Atemgasprobennahme in der Dimension „ $\delta^{13}\text{C}$ “, n = 29)

Basierend auf der Studie von Jackson *et al.* (1999) lassen sich die Probandinnen bezüglich des Zeitpunktes der maximalen $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas nach Aufnahme von ^{13}C -LU in verschiedene Gruppen einteilen. Dabei kann zwischen $^{13}\text{CO}_2$ - T_{\max} Werten im Zeitraum von 9-13 h, 15-16 h, > 16 h nach Aufnahme des Markers unterschieden werden. Auffällig in der vorliegenden Studie war zusätzlich eine Probandin, die zu keinem Zeitpunkt (von 6 Messtagen insgesamt 155 Proben analysiert) eine messbare $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas aufwies (Abb. 4-2, Probandin rechts unten). Dies wurde bei den Berechnungen der mittleren T_{\max} und der Erstellung der Atemgaszeitprofile berücksichtigt bzw. die Werte dieser Probandin wurden bei den Berechnungen ausgeschlossen.

Abbildung 4-2 zeigt exemplarisch individuelle Atemgaszeitprofile von vier Probandinnen, die nach Jackson *et al.* (1999) den o.g. Gruppen anhand der $^{13}\text{CO}_2$ - T_{\max} Werte zugeordnet werden können. Im Fall der Probandin mit T_{\max} 9-13 h nach Markeraufnahme ist ein schneller und früher Anstieg (ca. 6 Stunden nach Markeraufnahme) und ein ebenso schnelles Absinken der $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas erkennbar. Gleichzeitig weist diese Probandin eine im Vergleich zu den anderen Versuchspersonen und dem Basiswert höhere $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas auf. Der Basiswert der $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung ist bereits ca. 12 h nach Markeraufnahme wieder erreicht.

Bei einem $^{13}\text{CO}_2$ - T_{\max} Wert von 15-16 h nach Aufnahme von ^{13}C -LU ist ein Anstieg der $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung nach ca. 12 h erkennbar. Dabei ist die $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im aufgeführten Beispiel weniger stark ausgeprägt und die basale $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung wird im Zeitraum von ca. 18-30 h erreicht.

Ein langsamerer und späterer Anstieg zur maximalen $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung ca. 30 h nach Markeraufnahme ist bei einem T_{\max} von > 16 h zu erkennen. Teilweise ist hier die basale $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas 36 h nach ^{13}C -LU-Aufnahme noch nicht wieder erreicht (Abb. 4-2).

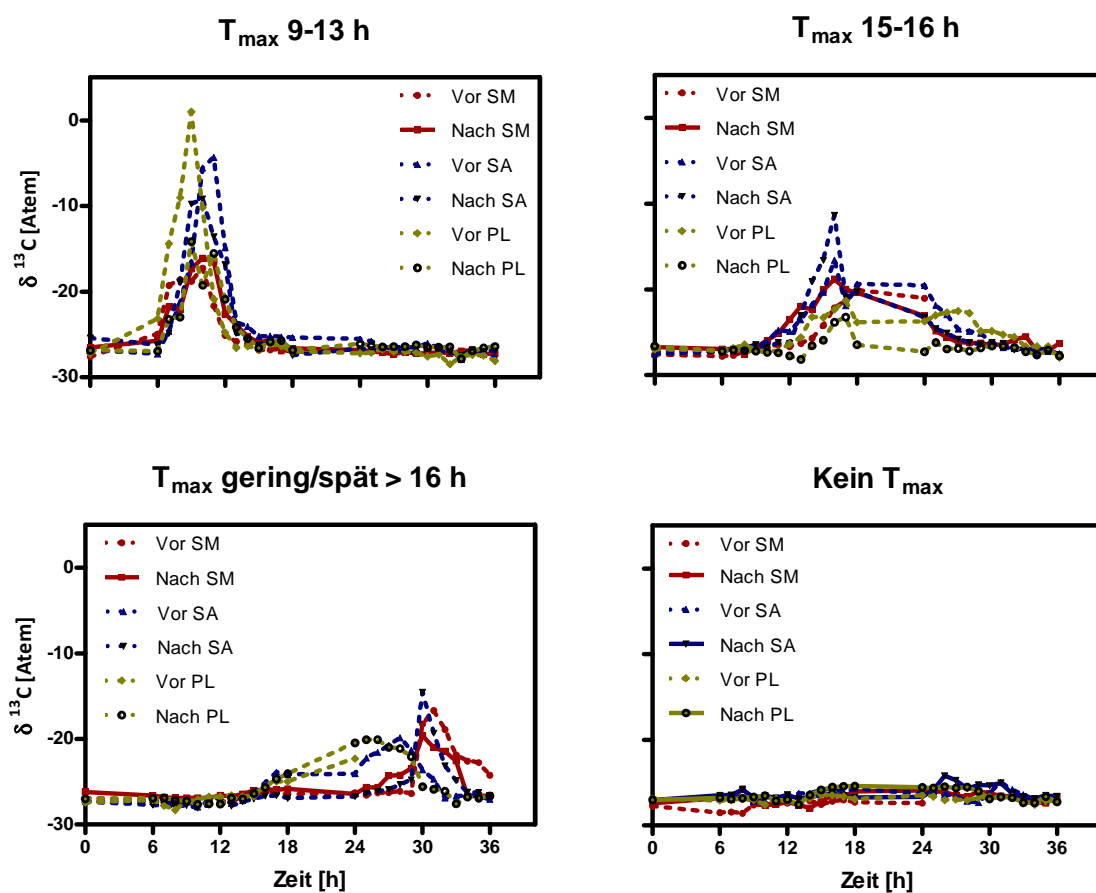


Abb. 4-2 $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofile von 4 Probandinnen aus Humanstudie I nach Aufnahme von ^{13}C -LU (500 mg) an den Messtagen vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) oder Placebo (PL) in der Dimension „ $\delta^{13}\text{C}$ “

4.1.3 Urinproben

4.1.3.1 Renale C- und ^{13}C -Exkretion

Die Bestimmung der renalen ^{13}C -Exkretion nach Aufnahme von ^{13}C -LU sollte Informationen über die intestinale Metabolisierung von ^{13}C -LU im Zusammenhang mit der $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung und renalen ^{15}N -Ausscheidung nach Aufnahme von $^{15}\text{N}_2$ -LU liefern. In den 6-24 h nach der ^{13}C -LU-Aufnahme analysierten Urinfraktionen lagen die renalen Gesamt-C- und ^{13}C -Exkretionen am höchsten. In diesem Sammelintervall wurden im Urin an den verschiedenen Messtagen zwischen 9,6 und 10,8 % der verabreichten ^{13}C -Dosis gemessen. In der Zeit von 0-6 h nach der ^{13}C -LU-Aufnahme wurden zwischen 3 und 4,4 % und im Intervall von 24-30 h weniger als 1 % der verabreichten ^{13}C -Dosis ausgeschieden (Tab. 4-2).

Tab. 4-2 Renale C- (mg) und ^{13}C -Exkretion (% Dosis) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen vor und nach den jeweils 14-tägigen Interventionen (MW \pm SD, n = 30, Ausnahme 24-30 h: n = 22)

Intervention ¹	Messtag	C [mg]			^{13}C [% Dosis]		
		0-6 h ²	6-24 h	24-30 h	0-6 h	6-24 h	24-30 h
SM	Vor	1,4 $\pm 0,8$	4,6 $\pm 1,4$	0,9 $\pm 0,4$	3,7 $\pm 3,6$	9,6 $\pm 3,7$	0,8 $\pm 0,5$
	Nach	1,4 $\pm 0,5$	5,0 $\pm 2,1$	1,0 $\pm 0,4$	3,0 $\pm 1,1$	10,0 $\pm 4,5$	0,7 $\pm 0,5$
P _I ³					0,881	0,962	0,801
SA	Vor	1,6 $\pm 0,9$	4,7 $\pm 2,0$	1,1 $\pm 0,5$	4,2 $\pm 3,8$	10,8 $\pm 6,1$	0,6 $\pm 0,6$
	Nach	1,3 $\pm 0,4$	4,7 $\pm 2,0$	1,2 $\pm 0,4$	3,1 $\pm 1,3$	10,1 $\pm 3,6$	0,7 $\pm 0,6$
P _I					0,610	0,803	0,823
PL	Vor	1,6 $\pm 1,3$	4,6 $\pm 2,2$	0,9 $\pm 0,4$	4,4 $\pm 5,3$	10,2 $\pm 5,6$	0,6 $\pm 0,6$
	Nach	1,2 $\pm 0,5$	5,4 $\pm 3,9$	1,1 $\pm 0,8$	2,9 $\pm 1,6$	10,4 $\pm 4,8$	0,7 $\pm 0,6$
P _I					0,403	0,810	0,562
P _{IA}					0,681	0,776	0,698

¹ SM = Smoothie, SA = Saft, PL = Placebo

² Zeiten für Urinsammlungen nach Aufnahme von 500 mg ^{15}N -LU durch die Probandinnen

³ P_I = P-Werte für Unterschiede zwischen „Vor“ und „Nach“ (Effekt der Intervention)

⁴ P_{IA} = P-Werte für Unterschiede zwischen Testgetränken (Effekt der Interventionsart)

Die 14-tägige Intervention mit Smoothie, Saft und Placebo führte zu keiner Änderung der renalen ^{13}C -Exkretion in den von 0-6, 6-24 und 24-30 h gesammelten Urinfraktionen (Tab. 4-2, Abb. 4-3). Es ergaben sich auch keine Unterschiede zwischen den drei Testgetränken. Auffällig erschienen 9 Ausreißer in der Urinfraktion 0-6 h nach der 14-tägigen Testgetränkzufuhr. Bei diesen wurde jeweils eine deutlich verminderte renale ^{13}C -Exkretion ermittelt (Abb. 4-3).

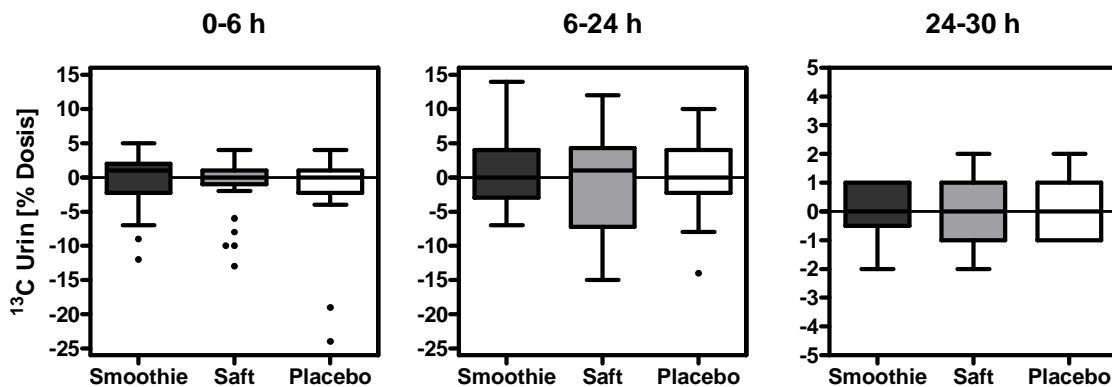


Abb. 4-3 Veränderungen der renalen ^{13}C -Ausscheidungen (% Dosis) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen nach Aufnahme von ^{13}C -LU (500 mg) 0-6, 6-24 und 24-30 Stunden nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie, Saft und Placebo (n = 30, Ausnahme 24-30 h: n = 22)

Die Abbildungen 4-4 und 4-5 zeigen die individuellen Verläufe der renalen ^{13}C -Ausscheidungen der einzelnen Probandinnen im Zeitraum von 0-6 und 6-24 h nach der ^{13}C -LU-Aufnahme.

Bis auf die Interventionsphase Smoothie 0-6 h (Abb. 4-4) ist die Anzahl an Probandinnen, die einen Anstieg, ein Absinken oder keine Änderung in der renalen ^{13}C -Ausscheidung nach 14-tägiger Intervention mit den Testgetränken aufwies, in beiden Urinfraktionen 0-6 h und 6-24 h ähnlich verteilt (Abb. 4-4, 4-5). Der Anteil der Probandinnen, die einen Anstieg in der ^{13}C -Ausscheidung im Urin nach den Interventionsabschnitten aufwies, entsprach nahezu dem Anteil der Probandinnen, bei denen ein Absinken festgestellt wurde. Die mittlere ^{13}C -Ausscheidung im Urin blieb insgesamt unberührt von den Interventionsabschnitten. In der von 0-6 h gesammelten Urinfraktion variierte die ^{13}C -Ausscheidung zwischen den Probandinnen von 0 bis 25 % und im Zeitraum von 6-24 h von 1 bis 29 % der verabreichten ^{13}C -Dosis (Abb. 4-4, 4-5, Anhang Tab. A-1, A-2). In beiden Urinfraktionen schwankten die Ausgangswerte der renalen ^{13}C -Ausscheidung bei den Probandinnen, die eine verminderte Ausscheidung nach den Interventionsabschnitten aufwiesen, deutlich stärker als bei denen, die einen Anstieg und im Vergleich „einheitlichere“ Ausgangswerte zeigten (Abb. 4-4, 4-5). Wie in Abbildung 4-3 sind die zwei Ausreißer in der 0-6 h Urinfraktion nach Placebointervention in Abbildung 4-4 deutlich erkennbar (Probandin 17, 23 weisen sehr hohe

Ausgangswerte auf). Diese wiesen besonders hohe renale ^{13}C -Ausscheidungen vor der Interventionsphase auf (Abb. 4-4).

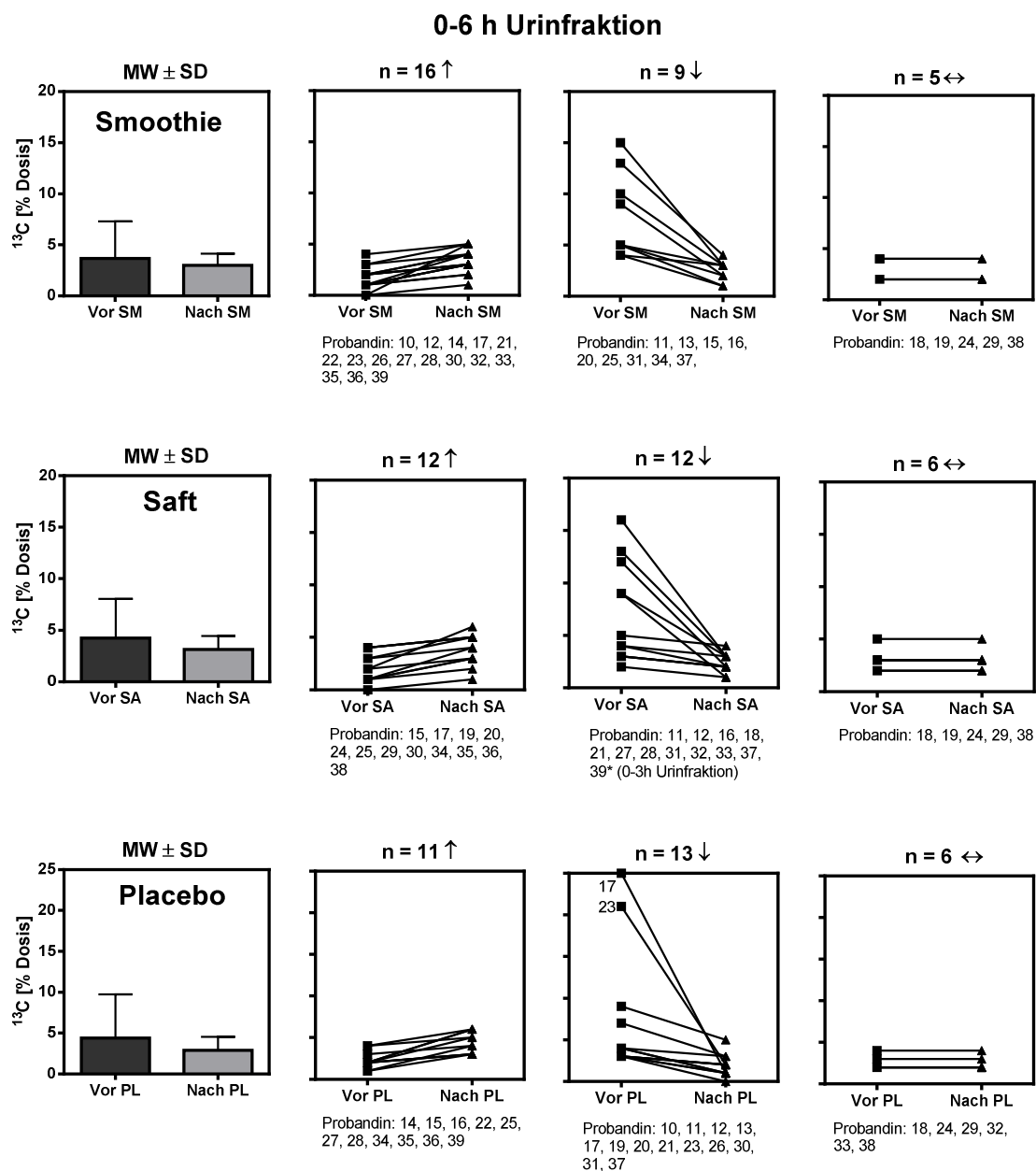


Abb. 4-4 Kumulative renale ^{13}C -Exkretion (% Dosis) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen 0-6 h nach Aufnahme von ^{13}C -LU (500 mg) vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) oder Placebo (PL) (MW \pm SD sowie individuelle Messwerte, \uparrow = Anstieg nach Intervention; \downarrow = Absinken nach Intervention; \leftrightarrow = keine Änderung nach Intervention)

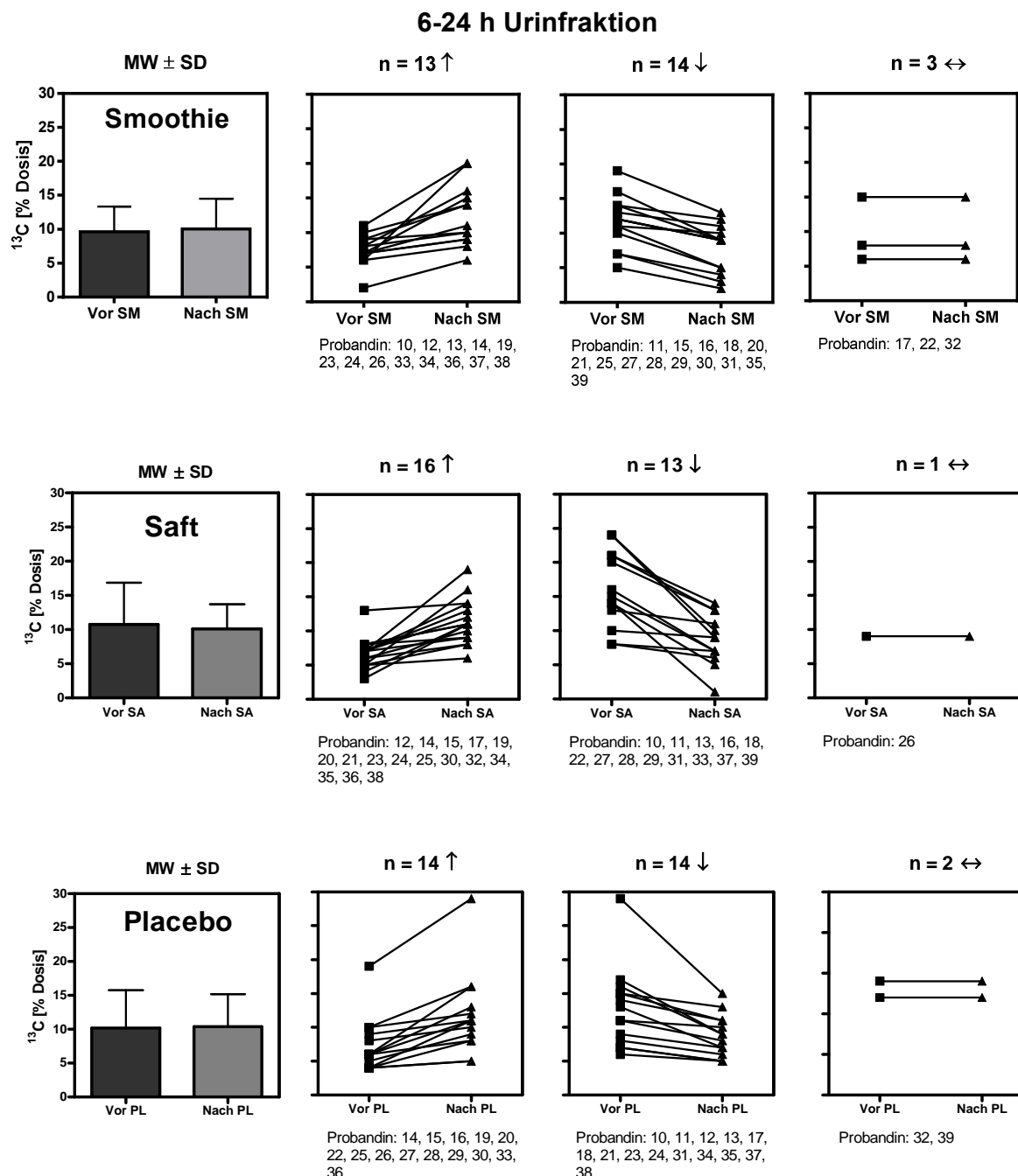


Abb. 4-5 Kumulative renale ^{13}C -Exkretion (% Dosis) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen 6-24 h nach Aufnahme von ^{13}C -LU (500 mg) vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (MW \pm SD sowie individuelle Messwerte, \uparrow = Anstieg nach Intervention, \downarrow = Absinken nach Intervention, \leftrightarrow = keine Änderung nach Intervention)

4.1.3.2 Renale N- und ^{15}N -Exkretion

Die Bestimmung der renalen N- und ^{15}N -Ausscheidungen der Probandinnen nach Aufnahme von $^{15}\text{N}_2$ -LU an den Messtagen sollte Hinweise zum intestinalen mikrobiellen N-Stoffwechsel vor und nach Aufnahme der Testgetränke sowie zur Untersuchung der intestinalen Metabolisierung von $^{15}\text{N}_2$ -LU liefern.

Die höchsten N- und ^{15}N -Mengen wurden in den von 6-24 h nach der $^{15}\text{N}_2$ -LU-Aufnahme gesammelten Urinproben der Probandinnen nachgewiesen (Tab. 4-3). In dieser Zeit wurden an den Messtagen zwischen durchschnittlich 5,5-6,5 mg N und 14,3-16,7 % ^{15}N der verabreichten Dosis ausgeschieden. Mit Ausnahme der N-Ausscheidung nach Placebo-Intervention fielen die renalen N- und ^{15}N -Ausscheidungen in den 24-30 h nach der $^{15}\text{N}_2$ -LU-Applikation gesammelten Urinfraktionen mit 1,2-1,6 mg N und 2,1-2,4 % der verabreichten ^{15}N -Dosis am geringsten aus (Tab. 4-3).

Tab. 4-3 Renale N- (mg) und ^{15}N -Exkretion (% Dosis) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen vor und nach den jeweils 14-tägigen Interventionen (MW \pm SD, n = 30, Ausnahme 25-30 h: n = 22)

Intervention ¹	Messtag	N [mg]			^{15}N [% Dosis]		
		0-6 h ²	6-24 h	24-30 h	0-6 h	6-24 h	24-30 h
SM	Vor	1,9 \pm 0,9	6,2 \pm 2,4	1,4 \pm 0,9	4,7 \pm 4,0	16,7 \pm 4,9	2,3 \pm 1,1
	Nach	1,8 \pm 0,7	6,0 \pm 2,8	1,3 \pm 0,6	3,8 \pm 1,4	15,4 \pm 6,5	2,1 \pm 1,2
P_{-1} ³					0,868	0,466	0,687
SA	Vor	2,2 \pm 1,2	6,1 \pm 2,2	1,4 \pm 0,8	4,9 \pm 4,1	15,9 \pm 7,5	2,2 \pm 1,5
	Nach	1,7 \pm 0,6	5,5 \pm 2,2	1,6 \pm 0,6	3,9 \pm 1,3	14,3 \pm 6,0	2,3 \pm 1,5
P_{-1}					0,797	0,446	0,942
PL	Vor	2,1 \pm 1,7	5,8 \pm 2,9	1,2 \pm 0,6	5,4 \pm 6,9	15,8 \pm 7,9	2,4 \pm 1,3
	Nach	1,5 \pm 0,6	6,5 \pm 4,7	1,6 \pm 1,2	3,3 \pm 1,7	16,7 \pm 9,5	2,2 \pm 1,2
P_{-1}					0,204	0,837	0,463
P_{-IA}					0,626	0,230	0,830

¹ SM = Smoothie, SA = Saft, PL = Placebo

² Zeiten für Urinsammlungen nach Aufnahme von 500 mg $^{15}\text{N}_2$ -LU durch die Probandinnen

³ P_{-1} = P-Werte für Unterschiede zwischen „Vor“ und „Nach“ (Effekt der Intervention)

⁴ P_{-IA} = P-Werte für Unterschiede zwischen Testgetränken (Effekt der Interventionsart)

Die Intervention mit den verschiedenen Testgetränken führte zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der N- und ^{15}N -Ausscheidungen im Urin. Ähnlich der renalen ^{13}C -Ausscheidung waren 10 Ausreißer bei den Differenzen der ^{15}N -Ausscheidung vor und nach Intervention in der Urinfraktion 0-6 h festzustellen. Diese wiesen eine deutlich verminderte renale ^{15}N -Ausscheidung nach 14-tägiger Zufuhr der Testgetränke auf (Abb. 4-6).

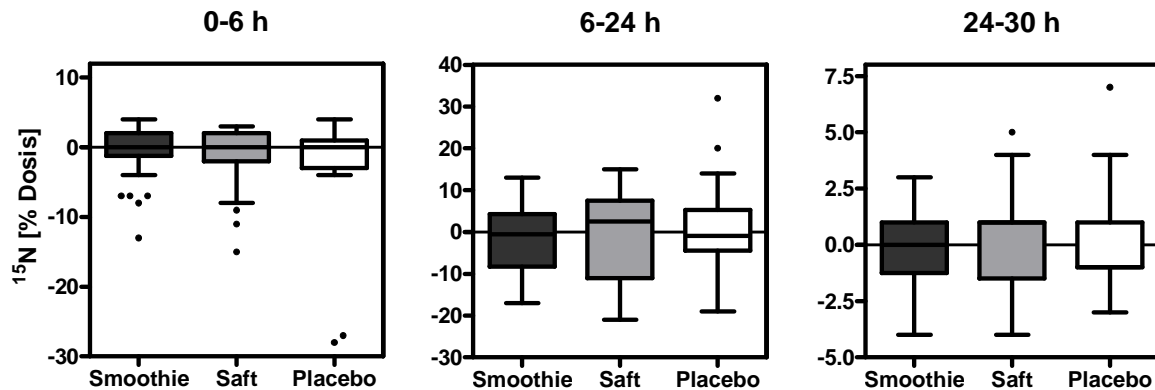


Abb. 4-6 Veränderungen der renalen ^{15}N -Ausscheidungen (% Dosis) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen nach Aufnahme von $^{15}\text{N}_2\text{-LU}$ (75 mg) 0-6, 6-24 und 24-30 Stunden nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie, Saft und Placebo (n=30, Ausnahme 24-30 h: n=22)

Bei Betrachtung der individuellen renalen ^{15}N -Ausscheidung der Probandinnen ergibt sich keine eindeutige Richtung. Die Anzahl der Probandinnen, die einen Anstieg, ein Absinken oder unveränderte ^{15}N -Werte nach den Interventionsabschnitten in den Urinfraktionen 0-6 und 6-24 h aufwiesen, ist ähnlich der renalen ^{13}C -Ausscheidung verteilt (Vgl. Abb. 4-4 und 4-7; 4-5 und 4-8). Die mittleren renalen ^{15}N -Ausscheidungen in den von 0-6 h und von 6-24 h nach der Markeraufnahme gesammelten Fraktionen wurden durch die Interventionsabschnitte mit den Testgetränken nicht beeinflusst. Wie bei der kumulativen renalen ^{13}C -Ausscheidung bestanden große inter- und intraindividuelle Unterschiede zwischen den Probandinnen. Die renalen ^{15}N -Ausscheidungen der Probandinnen variierten von 0-6 h zwischen 1 und 31 % und von 6-24 h zwischen 1 und 51 % der verabreichten Dosis ^{15}N (Abb. 4-7, 4-8, Anhang Tab. A-3, A-4).

Auffällig erscheint, dass die renalen ^{15}N - und ^{13}C -Ausscheidungen innerhalb einzelner Probandinnen insbesondere von 0-6 h ähnlich verliefen. Dies ist z.B. bei den Probandinnen 17 und 23 (Ausreißer) vor Aufnahme des Placebos gut erkennbar (Vgl. Abb. 4-4, 4-7). Ein solcher Zusammenhang zwischen den renalen ^{13}C - und ^{15}N -Ausscheidungen war in den von 6-24 h gesammelten Fraktionen weniger ausgeprägt.

Parallel der renalen ^{13}C -Ausscheidung zeigten die Probandinnen, die einen Anstieg der renalen ^{15}N -Ausscheidung nach 14-tägiger Intervention mit den Testgetränken aufwiesen, „einheitlichere“ Ausgangswerte als die Probandinnen, bei denen ein Absinken der renalen

^{15}N -Ausscheidung ermittelt wurde und die Ausgangswerte stärker streuten. Dies ist sowohl in der 0-6 h und 6-24 h Urinfraktion zu beobachten (Abb. 4-7, 4-8).

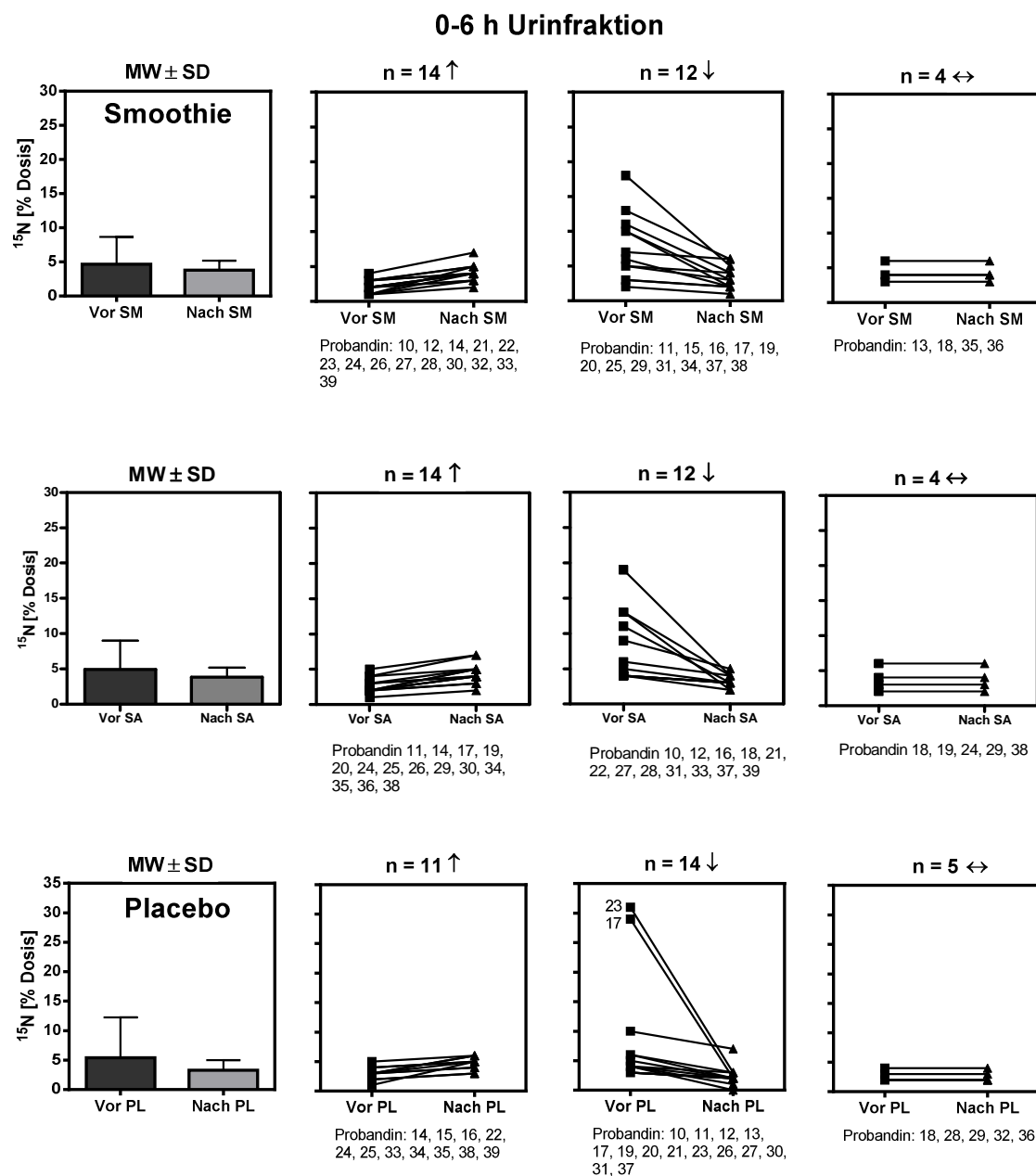


Abb. 4-7 Kumulative renale ^{15}N -Exkretion (% Dosis) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen 0-6 h nach Aufnahme von $^{15}\text{N}_2\text{-LU}$ (75 mg) vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (MW \pm SD sowie individuelle Messwerte, \uparrow = Anstieg nach Intervention, \downarrow = Absinken nach Intervention, \leftrightarrow = keine Änderung nach Intervention)

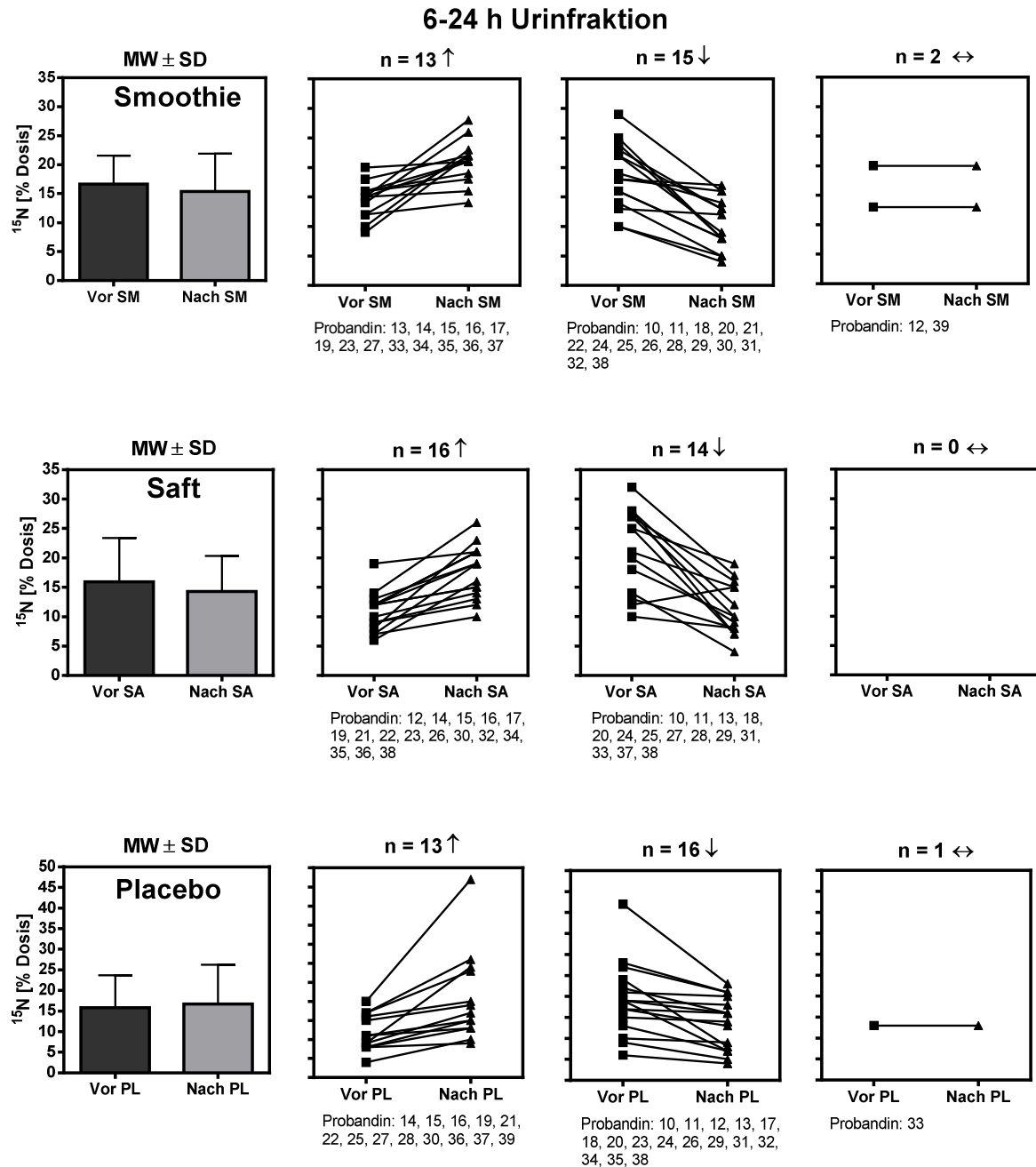


Abb. 4-8 Kumulative renale ^{15}N -Exkretion (% Dosis) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen 6-24 h nach Aufnahme von $^{15}\text{N}_2$ -LU (75 mg) vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (MW \pm SD sowie individuelle Messwerte, \uparrow = Anstieg nach Intervention, \downarrow = Absinken nach Intervention, \leftrightarrow = keine Änderung nach Intervention)

4.1.3.3 Renale p-Kresol-Exkretion

Die renale p-Kresol-Ausscheidung der Probandinnen diente zur Beurteilung proteolytischer Fermentationsaktivitäten der Bakterien im Colon vor und nach Zufuhr der Testgetränke. In der Urinfraktion 6-24 h wurde an allen Messtagen die höchste p-Kresol-Menge ausgeschieden und Werte zwischen 16,6-22,8 mg erreicht. Auffallend waren die hohen Standardabweichungen bei der p-Kresol-Ausscheidung in allen Urinfraktionen (Tab. 4-4). Die

14-tägigen Interventionen mit den Testgetränken führten zu keinen Veränderungen der p-Kresol-Ausscheidungen der Probandinnen. Dabei bestanden keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Testgetränken Smoothie, Saft und Placebo (Abb. 4-9, Tab. 4-4).

Tab. 4-4 Renale p-Kresol-Exkretion (mg) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen vor und nach den jeweils 14-tägigen Interventionen (MW \pm SD, n = 30, Ausnahme 25-30 h: n = 22)

Intervention ¹	Messtag	p-Kresol [mg]		
		0-6 h ²	6 – 24 h	24 – 30 h
SM	Vor	8,3 \pm 8,0	22,4 \pm 17,2	4,2 \pm 2,9
	Nach	6,6 \pm 6,0	20,9 \pm 22,2	5,5 \pm 7,7
P _{-I} ³		0,329	0,673	0,504
SA	Vor	5,4 \pm 3,6	18,5 \pm 15,0	6,0 \pm 6,7
	Nach	5,6 \pm 4,7	16,6 \pm 12,1	5,8 \pm 4,9
P _{-I}		0,959	0,644	0,350
PL	Vor	7,3 \pm 7,0	22,8 \pm 18,0	4,0 \pm 2,9
	Nach	6,3 \pm 5,8	17,7 \pm 14,2	5,3 \pm 4,8
P _{-I}		0,339	0,171	0,165
P _{-IA} ⁴		0,875	0,393	0,965

¹ SM = Smoothie, SA = Saft, PL = Placebo

² Zeiten für Urinsammlungen nach Aufnahme von 75 mg ¹⁵N-LU durch die Probandinnen

³ P_{-I} = P-Werte für Unterschiede zwischen „Vor“ und „Nach“ (Effekt der Intervention)

⁴ P_{-IA} = P-Werte für Unterschiede zwischen Testgetränken (Effekt der Interventionsart)

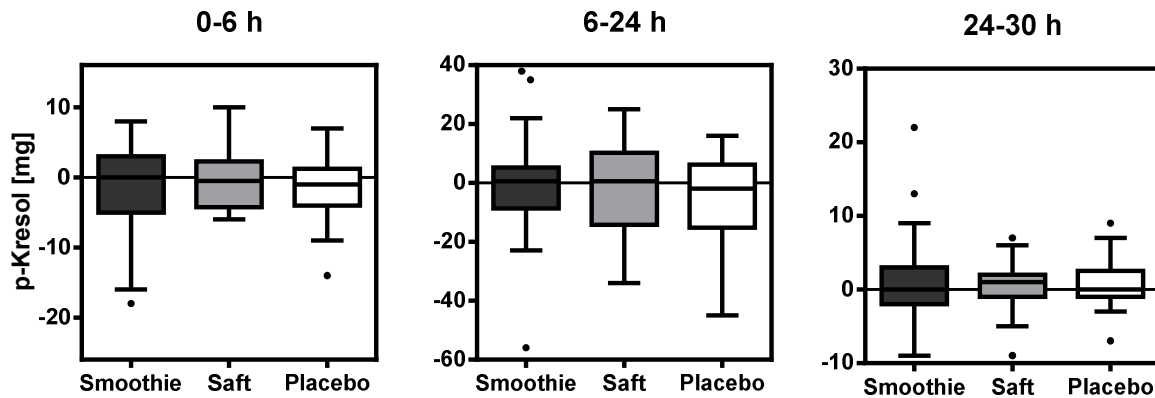


Abb. 4-9 Veränderungen der renalen p-Kresol-Ausscheidungen (mg) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen 0-6, 6-24 und 24-30 Stunden nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie, Saft oder Placebo (n=30, Ausnahme 24-30 h: n = 22)

Die Abbildungen 4-10 und 4-11 zeigen die individuellen Verläufe der renalen p-Kresol-Ausscheidung der Probandinnen. Dabei ist die sehr hohe Variabilität zwischen den Probandinnen erkennbar, wobei die p-Kresol-Ausscheidung in der 0-6 h Urinfraktion nach der Markeraufnahme zwischen ca. 0,35-34 mg und im Sammelabschnitt von 6-24 h zwischen ca. 0,73-98 mg lag (Abb. 4-10, 4-11, Anhang Tab. A-5, A-6). Die Anzahl der Probandinnen, die eine höhere oder verminderte p-Kresol-Ausscheidung nach den Interventionsabschnitten aufwiesen, war in beiden Urinsammelfraktionen ähnlich verteilt. Wie schon bei der renalen ^{13}C - und ^{15}N -Exkretion beobachtet, scheinen auch hier tendenziell die Ausgangswerte der p-Kresol-Ausscheidung bei den Probandinnen, bei denen ein Absinken der renalen p-Kresol-Exkretion nach der 14-tägigen Testgetränkezufuhr festzustellen war, stärker zu streuen als bei denen, die einen Anstieg aufwiesen (Abb. 4-10, 4-11).

Die 14-tägige Zufuhr der Testgetränke Smoothie, Saft und Placebo führte zu keiner Änderung der mittleren p-Kresol-Ausscheidung der Probandinnen in den Urinfraktionen 0-6 h und 6-24 h (Abb. 4-10, 4-11).

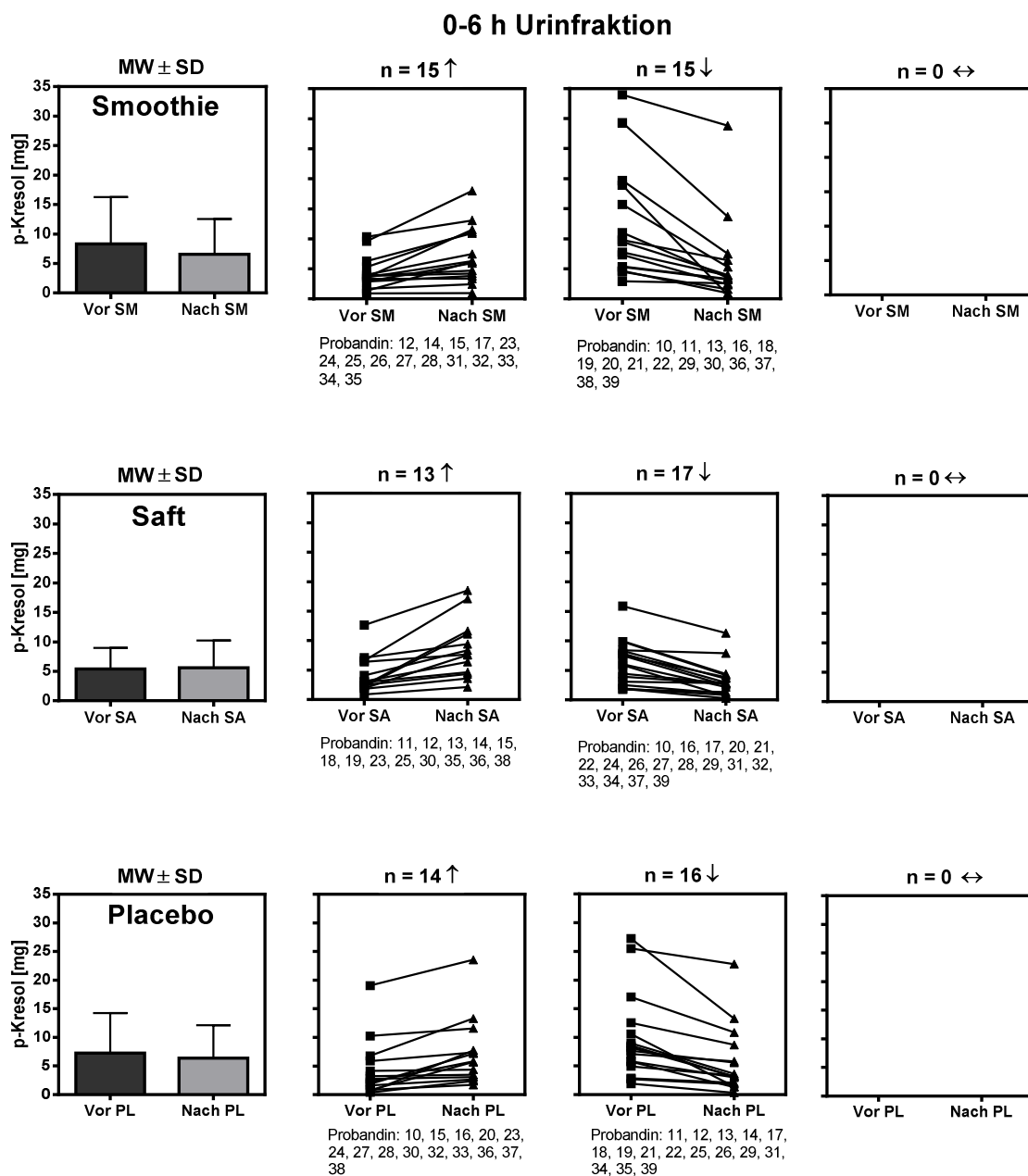


Abb. 4-10 Kumulative renale p-Kresol-Exkretion (mg) der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen 0-6 h vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) oder Placebo (PL) (MW \pm SD sowie individuelle Messwerte, \uparrow = Anstieg nach Intervention, \downarrow = Absinken nach Intervention, \leftrightarrow = keine Änderung nach Intervention)

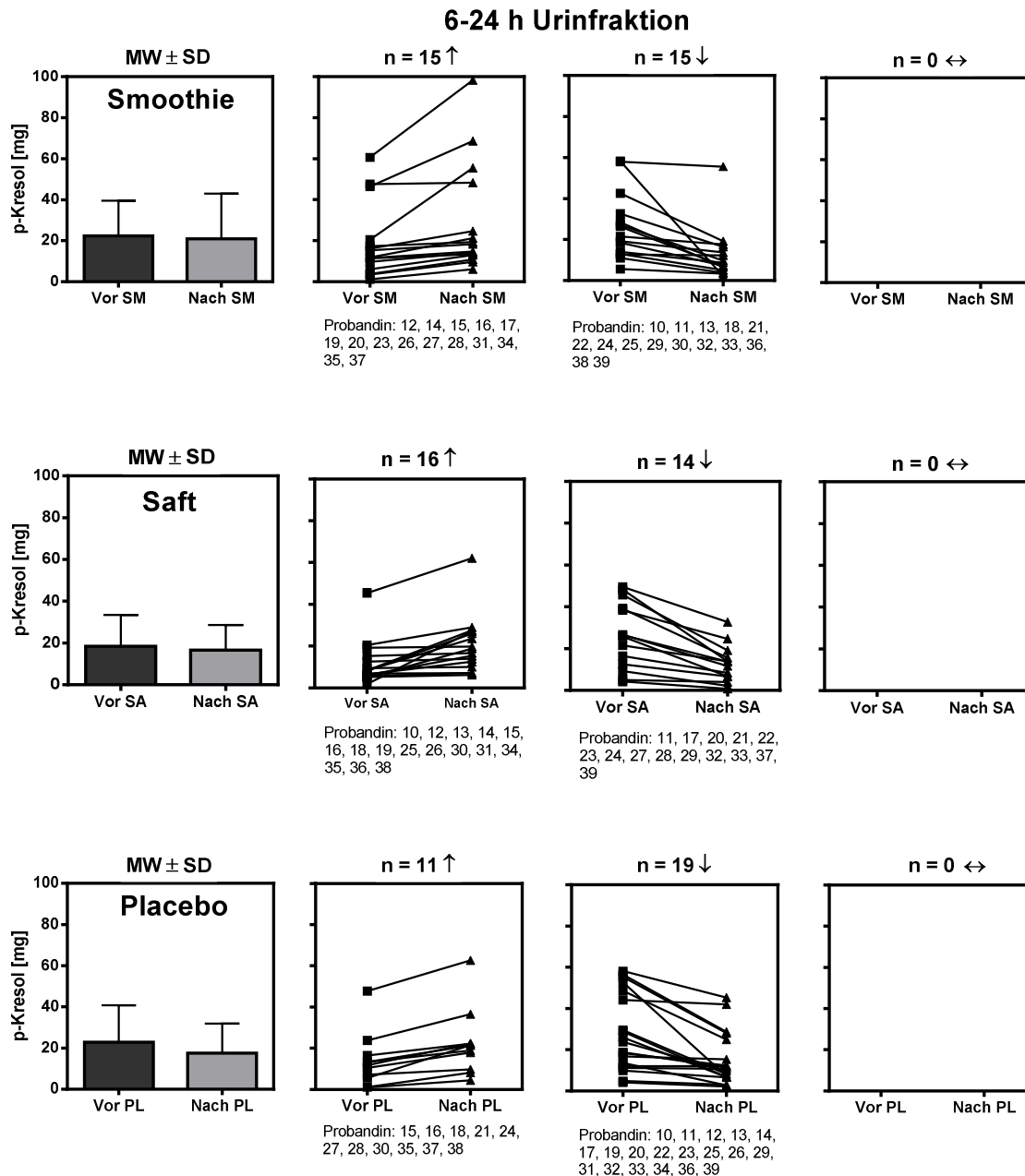


Abb. 4-11 Kumulative renale p-Kresol-Exkretion (mg) der Probandinnen an den Messtagen 6-24 h vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (MW \pm SD sowie individuelle Messwerte, \uparrow = Anstieg nach Intervention, \downarrow = Absinken nach Intervention, \leftrightarrow = keine Änderung nach Intervention)

4.1.4 Stuhlproben

4.1.4.1 Trockenmasse und pH-Wert

Die Trockenmasse (TM) des Stuhls diente als Bezugsgröße für die Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren und die Gesamtkeimzahl, während der pH-Wert zur Beurteilung des intestinalen Milieus dienen sollte. Die Trockensubstanzgehalte und pH-Werte der Stuhlproben der Probandinnen an den Messtagen variierten inter- und intraindividuell sehr

stark. Der pH-Wert blieb im Mittel unbeeinflusst von den Interventionen und die verschiedenen Testgetränke wirkten sich nicht unterschiedlich aus. Gleiches scheint für die Trockensubstanz zu gelten. An allen Messtagen lagen die mittleren Trockensubstanzgehalte der Stuhlproben zwischen knapp 20 bis ca. 24 % und die mittleren pH-Werte zwischen 6,7 und 6,9 (Tab. 4-5).

Tab. 4-5 Trockensubstanzgehalte (%) und pH-Werte von Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I vor und nach 14-tägiger Intervention mit den Testgetränken (MW \pm SD, n = 30)

Parameter	Durchgang I (SM) ¹		Durchgang II (SA)		Durchgang II (PL)	
	Vor ²	Nach	Vor	Nach	Vor	Nach
Trockensubstanz (%)	22,5 ± 10,9	20,8 ± 7,2	22,9 ± 8,2	24,2 ± 17,1	19,8 ± 8,2	22,2 ± 7,9
pH-Wert	6,8 ± 1,2	6,7 ± 1,2	6,9 ± 0,8	6,9 ± 1,0	6,8 ± 0,9	6,8 ± 1,3
P _{pH-I} ³	0,465		0,643		0,658	
P _{pH-A} ⁴	0,485					

¹ Angabe der Testgetränke in Klammern: SM = Smoothie, SA = Saft, PL = Placebo

² „Vor“ = Messtage vor der Intervention, „Nach“ = Messtage nach der Intervention

³ $P_{\text{pH-I}}$ = P-Werte für Unterschiede im pH-Wert zwischen „Vor“ und „Nach“ (Effekt der Intervention)

⁴ $P_{\text{pH-IA}}$ = P-Werte für Unterschiede im pH-Wert zwischen Testgetränken (Effekt der Interventionsart)

Die individuellen pH-Wert-Verläufe in Stuhlproben der Probandinnen sind in Abbildung 4-12 dargestellt. An den Messtagen schwankte der pH-Wert zwischen ca. 4,6 und 9,3, wobei die 14-tägige Intervention mit Smoothie, Saft und Placebo bei jeweils 17 nicht immer denselben Probandinnen zu vermindertem und bei 12 bzw. 11 (Smoothie) Probandinnen zu höherem pH-Wert im Stuhl führte (Abb. 4-12, Anhang Tab. A-10).

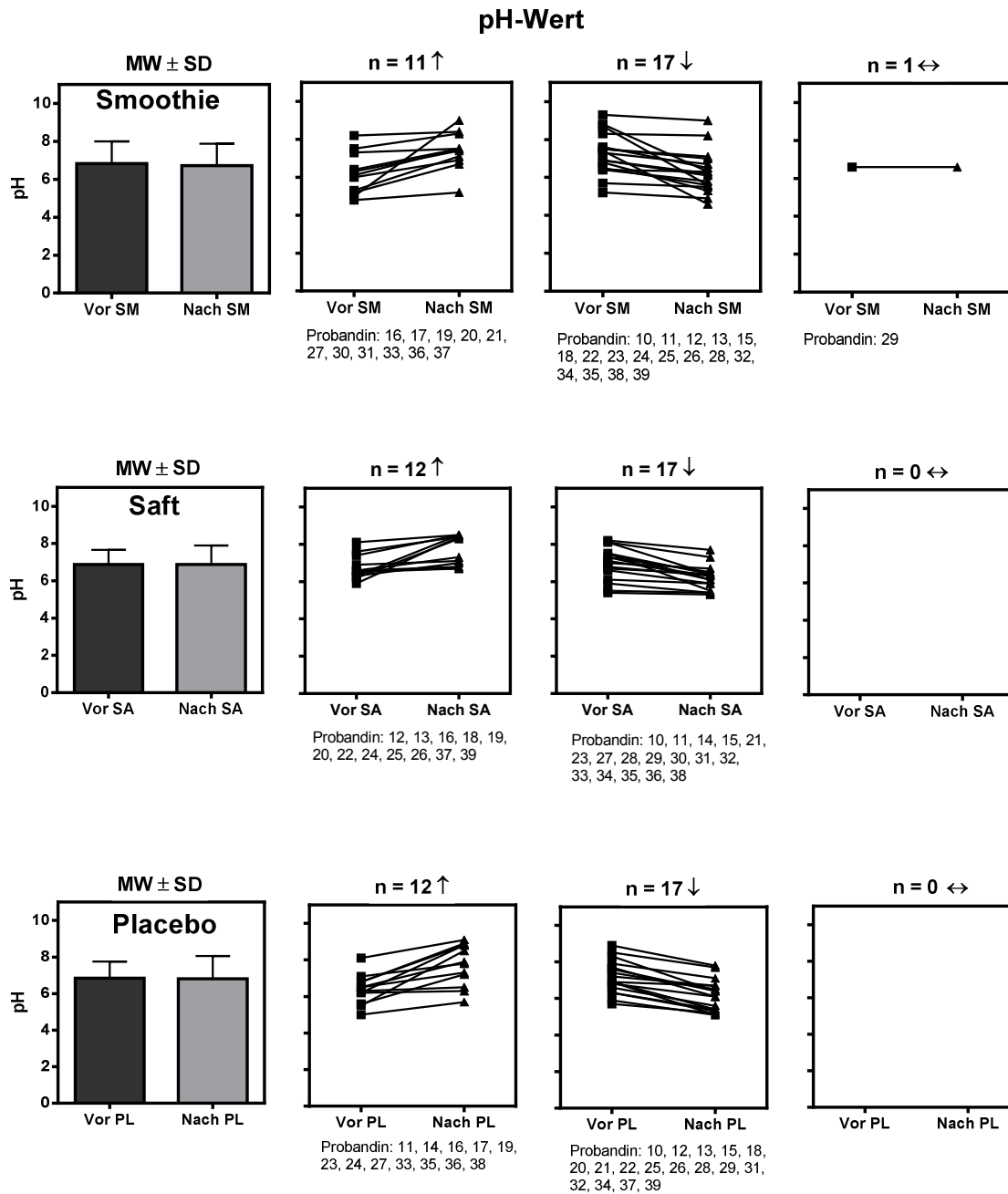


Abb. 4-12 pH-Wert in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (MW \pm SD sowie individuelle Messwerte, \uparrow = Anstieg nach Intervention, \downarrow = Absinken nach Intervention, \leftrightarrow = keine Änderung nach Intervention)

4.1.4.2 Kurzkettige Fettsäuren

Die kurzkettigen Fettsäuren in Stuhlproben der Probandinnen wurden mit zwei unterschiedlichen Methoden bestimmt. Das gekoppelte GC/MS-Verfahren war zunächst nur für die Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat vorgesehen. Als Hauptfermentationsprodukt des bakteriellen Abbaus von Kohlenhydraten im Colon sollte deren Bestimmung im Stuhl dazu dienen, einen möglichen Einfluss der Testgetränke auf die bakterielle

Kohlenhydratfermentation im Colon aufzuzeigen. Einerseits wurden dafür die isolierten Konzentrationen von Acetat, Propionat und Butyrat bestimmt und andererseits dienten diese zur Berechnung der Gesamtkonzentration an kurzkettigen Fettsäuren sowie dem Verhältnis dieser zueinander.

Aufgrund der zunächst nicht vorgesehenen Analyse von Isobutyrat, Isovalerat und Valerat in Stuhlproben der Probandinnen und teilweise unzureichendem Probenmaterial fand deren Bestimmung und Auswertung separat und zu einem späteren Zeitpunkt statt. Das gekoppelte GC/MS-Verfahren stand dabei nicht mehr zur Verfügung, sodass allein die gaschromatographische Methode genutzt wurde. Aufgrund der geringeren Anzahl an Beobachtungswerten und unzureichendem Probenmaterial war eine statistische Auswertung sowie die Darstellung der individuellen Verläufe für die Isobutyrat-, Isovalerat- und Valerat-Konzentration in Stuhlproben der Probandinnen weniger sinnvoll bzw. nicht möglich. Die Bestimmung dieser Fettsäuren kann daher lediglich „ergänzend“ zur Untersuchung des Einflusses der Testgetränke auf bakterielle, proteolytische Fermentationsvorgänge im Colon gesehen werden.

Acetat, Propionat und Butyrat

Die Konzentrationen von Acetat, Propionat und Butyrat in Stuhlproben der Probandinnen variierten inter- und intraindividuell extrem stark. Die höchsten Konzentrationen wurden für Acetat gemessen. Sie erreichten im Mittel 73,5-97,2 $\mu\text{mol/g TM}$ Stuhl, gefolgt von Propionat mit 30,6-39,5 $\mu\text{mol/g TM}$ und Butyrat mit 21,9-28,0 $\mu\text{mol/g TM}$ (Tab. 4-6).

Dabei blieben die Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren unbeeinflusst von den 14-tägigen Interventionsabschnitten und den Testgetränken. Auffällig ist auch hier die relativ hohe Zahl von bis zu 15 Ausreißern (Acetat). Dabei war teilweise ein starker Anstieg oder ein starkes Absinken der Konzentration von Acetat, Propionat und Butyrat in Stuhlproben der Probandinnen zu beobachten (Abb. 4-13).

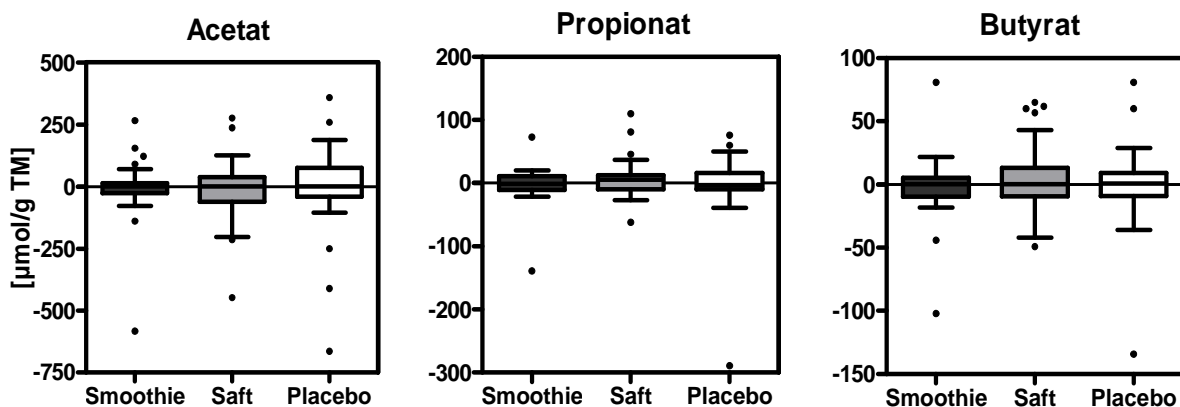


Abb. 4-13 Veränderungen der Konzentrationen ($\mu\text{mol/g TM}$) von Acetat, Propionat und Butyrat in Stuhlproben der 30 Probandinnen aus Humanstudie I vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie, Saft und Placebo (TM = Trockenmasse)

Tab. 4-6 Konzentrationen ($\mu\text{mol/g TM}$) von Acetat, Propionat und Butyrat in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (MW \pm SD, n = 30)

Fettsäure	Durchgang I (SM) ¹		Durchgang II (SA)		Durchgang III (PL)	
	Vor ²	Nach	Vor	Nach	Vor	Nach
Acetat	84,0 ± 129,0	73,5 ± 82,2	94,6 ± 111,7	82,9 ± 83,7	97,2 ± 166,4	92,9 ± 98,6
P-I ³	0,754		0,673		0,854	
P-IA ⁴	0,964					
Propionat	33,6 ± 29,6	30,6 ± 15,4	30,6 ± 17,8	37,0 ± 28,0	39,5 ± 54,0	35,4 ± 24,6
P-I	0,821		0,517		0,770	
P-IA	1,0					
Butyrat	24,4 ± 23,5	21,9 ± 15,3	23,5 ± 16,5	28,0 ± 22,3	27,4 ± 28,9	27,3 ± 21,2
P-I	0,758		0,673		0,829	
P-IA	0,902					
Summe	142,0 ± 178,0	126,1 ± 107,5	148,6 ± 141,5	147,9 ± 121,1	164,1 ± 242,8	155,6 ± 134,8
P-I	0,644		0,975		0,804	
P-IA	0,786					

¹ Angabe der Testgetränke in Klammern: SM = Smoothie, SA = Saft, PL = Placebo

² „Vor“ = Messtage vor der Intervention, „Nach“ = Messtage nach der Intervention

³ P_{-I} = P-Werte für Unterschiede zwischen „Vor“ und „Nach“ (Effekt der Intervention)

⁴ P_{-IA} = P-Werte für Unterschiede zwischen Testgetränken (Effekt der Interventionsart)

Auch die Gesamtkonzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren aus der Summe von Acetat, Propionat und Butyrat sowie das Verhältnis dieser Fettsäuren zueinander variierten zwischen den Probandinnen sehr stark. Auffällig erscheinen zudem die sehr hohen Standardabweichungen. Weder die Interventionsabschnitte noch die Art der Testgetränke wirkten sich signifikant auf die Gesamtkonzentration und das Verhältnis von Acetat, Propionat und Butyrat zueinander aus (Tab. 4-6; Abb. 4-14).

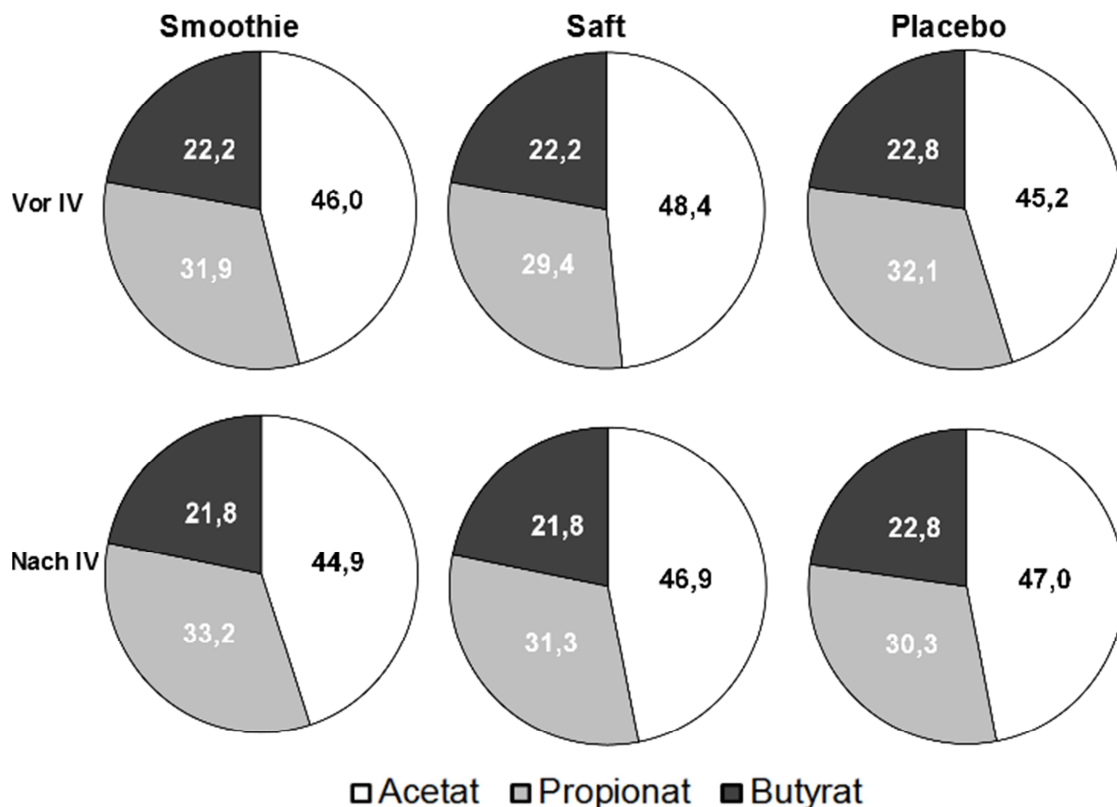


Abb. 4-14 Mittlere Anteile von Acetat, Propionat und Butyrat (%) an den Gesamtkonzentrationen (Summe aus Acetat, Propionat und Butyrat) kurzkettiger Fettsäuren in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie, Saft und Placebo (IV = Intervention, n=30)

Die Darstellung der individuellen Konzentrationen von Acetat, Propionat und Butyrat im Stuhl verdeutlicht die große inter- und intraindividuelle Variabilität (Abb. 4-15, 4-16, 4-17). In den Stuhlproben der Probandinnen konnten für Acetat Werte zwischen ca. 3-766 $\mu\text{mol/g}$ TM, bei Propionat zwischen ca. 4-314 $\mu\text{mol/g}$ TM und bei Butyrat zwischen 6-164 $\mu\text{mol/g}$ TM gemessen werden (Abb. 4-15, 4-16, 4-17, Anhang Tab. A-7, A-8, A-9).

Mit Ausnahme der Konzentrationen von „Propionat nach Smoothie- und Saftintervention“ (Abb. 4-16) sowie der Butyratkonzentration nach Placebointervention (Abb. 4-17) ist die Anzahl der Probandinnen, die einen Anstieg und ein Absinken nach 14-tägiger Zufuhr der Testgetränke aufwiesen, nahezu gleichmäßig verteilt.

Parallel zu den bestimmten Urinparametern scheinen auch hier die Ausgangskonzentrationen der drei Fettsäuren bei den Probandinnen, bei denen ein Absinken der Konzentration der Fettsäuren im Stuhl nach den Interventionsabschnitten zu verzeichnen war, tendenziell stärker zu streuen als bei denjenigen, die einen Anstieg aufwiesen (Abb. 4-15, 4-16, 4-17). Die mittleren Konzentrationen von Acetat, Propionat und Butyrat wurden durch keines der Testgetränke beeinflusst (Abb. 4-15, 4-16, 4-17). Die z.T. sehr starken Unterschiede zwischen „vor“ und „nach“ den Interventionsabschnitten gemessenen Werten, z.B. bei Acetat, entsprechen den Ausreißern in Abbildung 4-13.

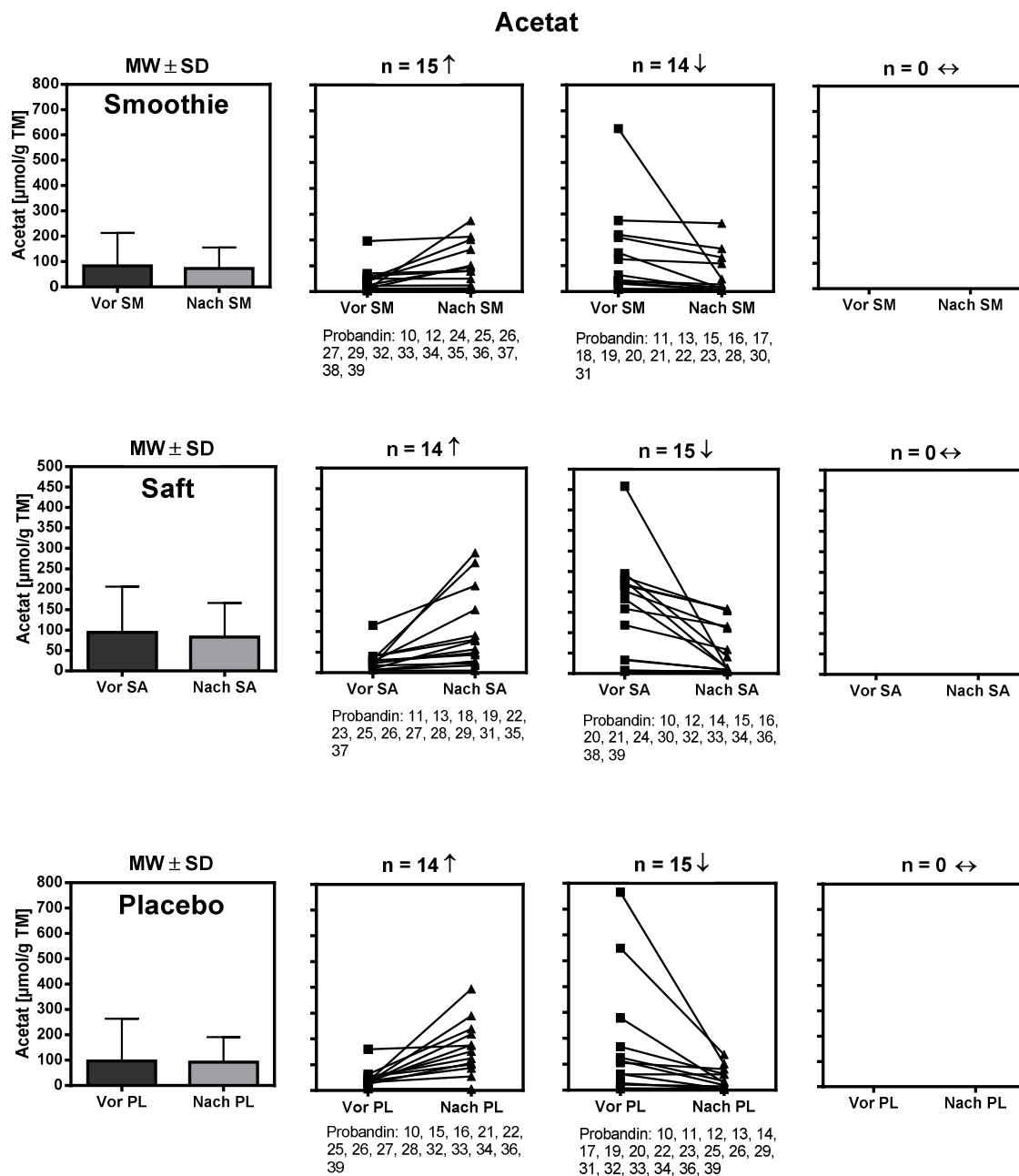


Abb. 4-15 Acetatkonzentration ($\mu\text{mol/g TM}$) in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (MW \pm SD sowie individuelle Messwerte, \uparrow = Anstieg nach Intervention, \downarrow = Absinken nach Intervention, \leftrightarrow = keine Änderung nach Intervention, TM = Trockenmasse)

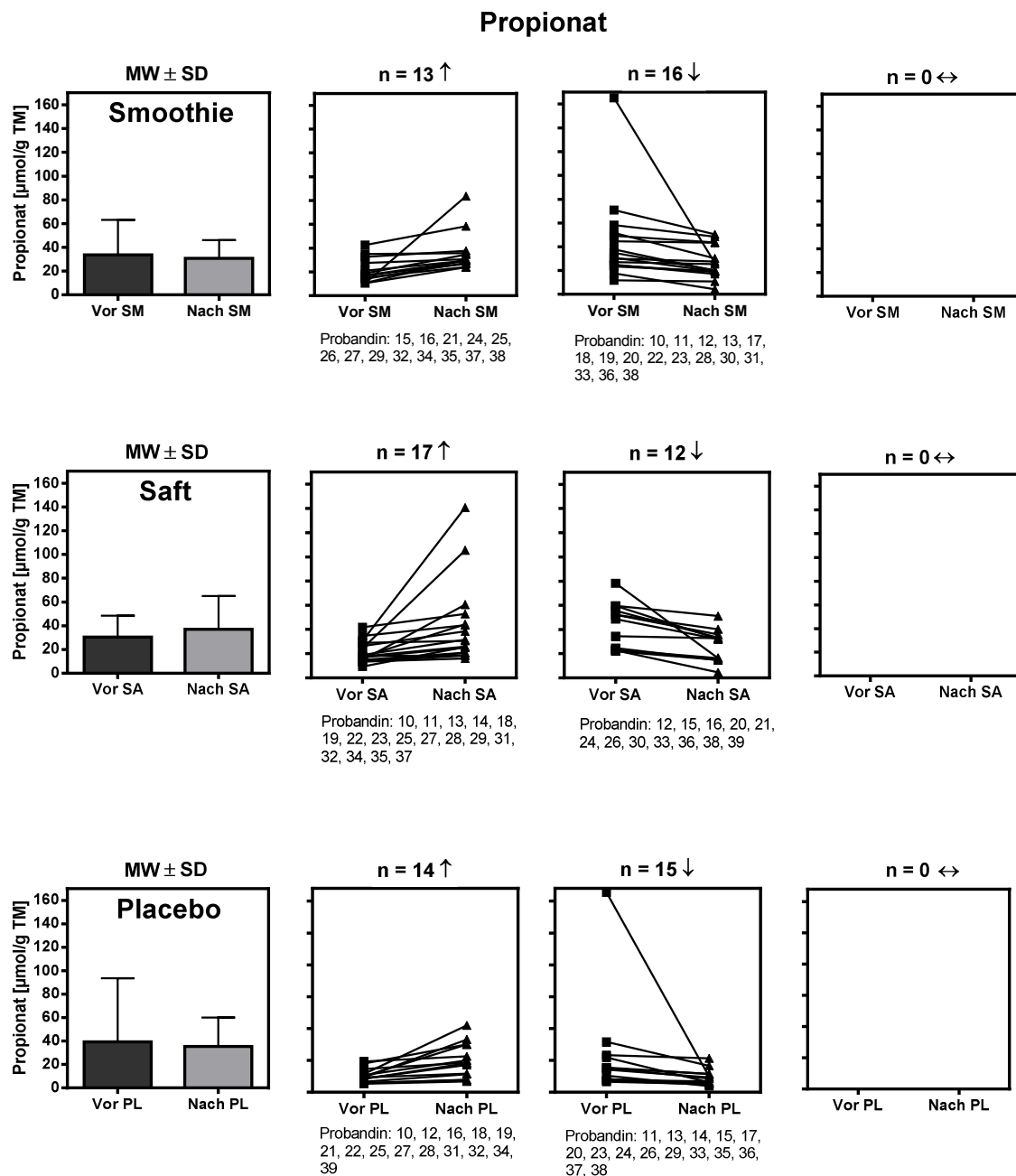


Abb. 4-16 Propionatkonzentrationen ($\mu\text{mol/g TM}$) in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (MW \pm SD sowie individuelle Messwerte, \uparrow = Anstieg nach Intervention, \downarrow = Absinken nach Intervention, \leftrightarrow = keine Änderung nach Intervention, TM = Trockenmasse)

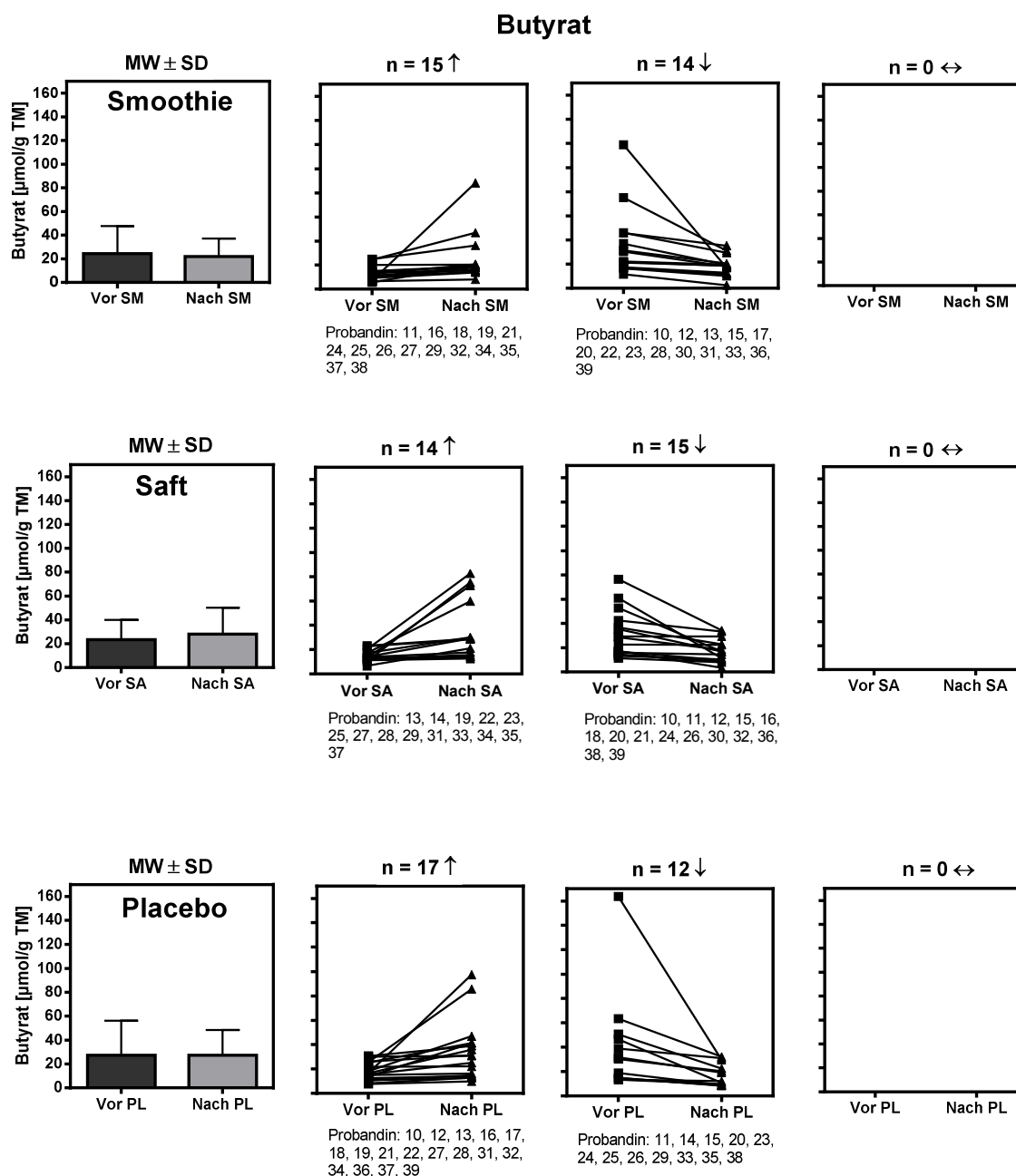


Abb. 4-17 Butyratkonzentrationen ($\mu\text{mol/g TM}$) in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (MW \pm SD sowie individuelle Messwerte, \uparrow = Anstieg nach Intervention, \downarrow = Absinken nach Intervention, \leftrightarrow = keine Änderung nach Intervention, TM = Trockenmasse)

Isobutyrat, Isovalerat und Valerat

Auch die Konzentrationen von Isobutyrat, Isovalerat und Valerat in Stuhlproben der Probandinnen variierten inter- und intraindividuell stark. Dies legt nahe, dass sie im Mittel unbeeinflusst von den Interventionsabschnitten und den Testgetränken blieben (Tab. 4-7, Abb. 4-18).

Die Konzentrationen waren für Isobutyrat und Isovalerat deutlich höher als für Valerat. An allen Messtagen wurden für Isobutyrat im Mittel Werte zwischen $10,9 \pm 8,7$ und $30,6 \pm 41,9$ $\mu\text{mol/g TM}$, für Isovalerat Werte zwischen $16,4 \pm 14,8$ und $27,2 \pm 26,3$ $\mu\text{mol/g TM}$ und für Valerat Werte zwischen $4,5 \pm 3,6$ und $13,2 \pm 22,7$ $\mu\text{mol/g TM}$ ermittelt. Wie bei Acetat, Propionat und Butyrat lagen auch hier sehr hohe Standardabweichungen vor.

Tab. 4-7 Konzentrationen ($\mu\text{mol/g TM}$) von Isobutyrat, Isovalerat und Valerat in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (MW \pm SD)

Fettsäure	Durchgang I (SM) ¹		Durchgang II (SA)		Durchgang III (PL)	
	Vor ² (n=23)	Nach (n=27)	Vor (n=29)	Nach (n=23)	Vor (n=25)	Nach (n=28)
Isobutyrat	17,8 $\pm 30,4$	13,6 $\pm 17,3$	25,1 $\pm 35,7$	30,6 $\pm 41,9$	12,2 $\pm 13,3$	10,9 $\pm 8,7$
Isovalerat	22,2 $\pm 30,5$	18,4 $\pm 15,0$	23,1 $\pm 34,1$	27,2 $\pm 26,3$	16,4 $\pm 14,8$	18,2 $\pm 15,3$
Valerat	13,2 $\pm 22,7$	4,5 $\pm 3,6$	8,4 $\pm 6,6$	8,3 $\pm 5,9$	8,9 $\pm 10,1$	5,9 $\pm 4,8$

¹ Angabe der Testgetränke in Klammern: SM = Smoothie, SA = Saft, PL = Placebo

² „Vor“ = Messtage vor der Intervention, „Nach“ = Messtage nach der Intervention

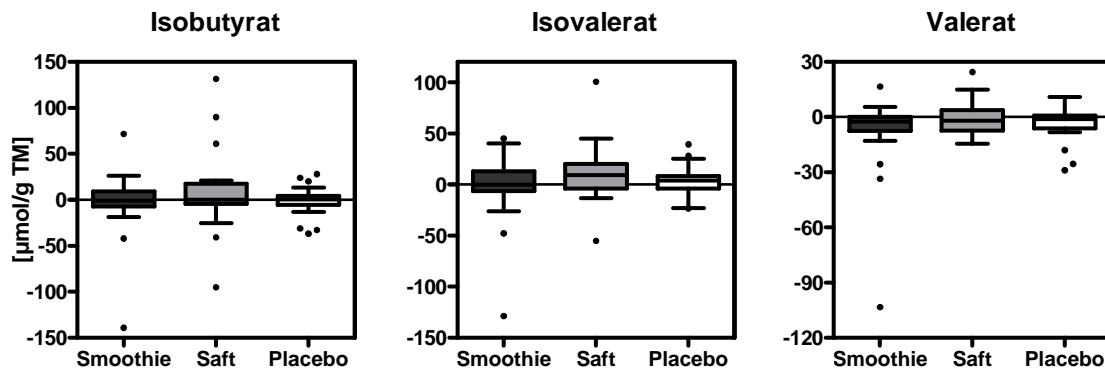


Abb. 4-18 Veränderungen der Konzentrationen ($\mu\text{mol/g TM}$) von Isobutyrat, Isovalerat und Valerat in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie, Saft und Placebo (TM = Trockenmasse, Smoothie: n = 23, Saft: n = 23, Placebo: n = 25)

4.1.4.3 Gesamtkeimzahl

Die Gesamtkeimzahl in Stuhlproben der Probandinnen sollte Informationen über den Einfluss der Testgetränke direkt auf die Bakterienpopulation im Colon liefern. Die Bestimmung erfolgte über Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit der EUB 338 Sonde zur Detektion aller Bakterien mittels Durchflusszytometrie.

Insgesamt waren die Gesamtkeimzahlen bei relativ großen Streuungen sehr niedrig und lagen an allen Messtagen in der Größenordnung von 10^7 pro g TM Stuhl. Die 14-tägigen Interventionen mit den Testgetränken führten zu keinen signifikanten Veränderungen weder beim Vergleich der Werte vor und nach den Interventionen noch zwischen den Testgetränken (Tab. 4-8; Abb. 4-19).

Tab. 4-8 Gesamtkeimzahlen ($\text{KbEx}10^7/\text{g TM}$)¹ in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (MW \pm SD, n=30)

Gesamtkeimzahl	Durchgang I (SM) ²		Durchgang II (SA)		Durchgang III (PL)	
	Vor ³	Nach	Vor	Nach	Vor	Nach
	5,13 ± 4,36	5,50 ± 4,41	3,91 ± 2,92	4,83 ± 5,95	5,17 ± 5,22	5,22 ± 2,55
P _I ⁴	0,586		0,926		0,347	
P _{IA} ⁵	0,786					

¹ KbE = Koloniebildende Einheiten

² Angabe der Testgetränke in Klammern: SM = Smoothie, SA = Saft, PL = Placebo

³ „Vor“ = Messtage vor der Intervention, „Nach“ = Messtage nach der Intervention

⁴ P_I = P-Werte für Unterschiede zwischen „Vor“ und „Nach“ (Effekt der Intervention)

⁵ P_{IA} = P-Werte für Unterschiede zwischen Testgetränken (Effekt der Interventionsart)

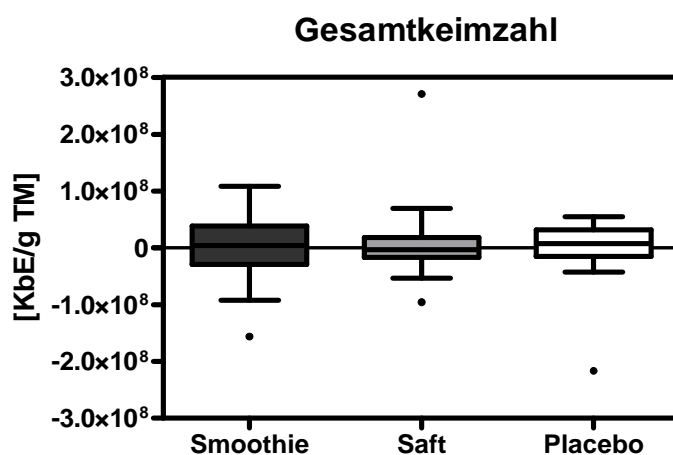


Abb. 4-19 Veränderungen der Gesamtkeimzahlen (KbE/g TM) in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie, Saft und Placebo (KbE = Koloniebildende Einheiten, TM = Trockenmasse, n=30)

Wie bei den zuvor beschriebenen Parametern variierte auch die Gesamtkeimzahl in Stuhlproben inter- und intraindividuell sehr stark und blieb im Mittel unbeeinflusst von der 14-tägigen Zufuhr der Testgetränke Smoothie, Saft und Placebo. Die Anzahl der Probandinnen, die nach den Interventionen höhere oder niedrigere Gesamtkeimzahlen in den Stuhlproben aufwiesen, waren auch hier in den Testgruppen ähnlich verteilt (Abb. 4-20).

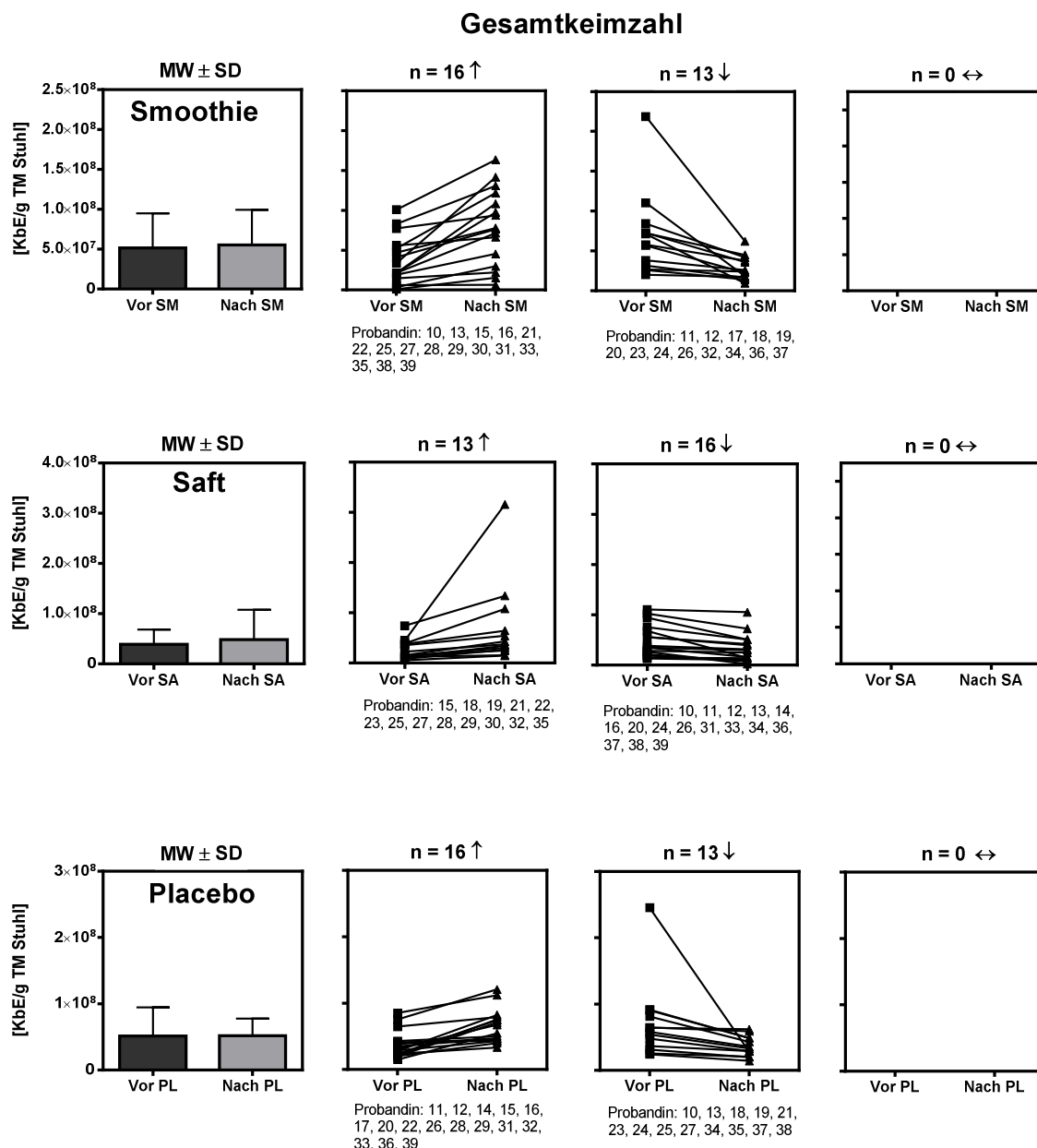


Abb. 4-20 Gesamtkeimzahlen (KbE/ g TM) in Stuhlproben der Probandinnen aus Humanstudie I an den Messtagen vor und nach 14-tägiger Intervention mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (MW \pm SD sowie individuelle Messwerte, \uparrow = Anstieg nach Intervention, \downarrow = Absinken nach Intervention, \leftrightarrow = keine Änderung nach Intervention, KbE = Koloniebildende Einheiten, TM = Trockenmasse)

Für Humanstudie I lässt sich festhalten, dass die untersuchten Merkmale und Parameter in Atemgas-, Urin- und Stuhlproben starken inter- und intraindividuellen Streuungen unterliegen. Daher lassen sich auf der Basis von Mittelwerten keine signifikanten Einflüsse der 14-tägigen Interventionen mit den Testgetränken Smoothie, Saft und Placebo erkennen.

4.2 Humanstudie II

Die Humanstudie II wurde im Rahmen einer Bioverfügbarkeitsstudie zu Anthocyanen durchgeführt, wofür eine Anzahl von 10 Probanden/-innen vorgesehen war. Dabei diente sie gleichzeitig zur Untersuchung möglicher „kurzfristiger Effekte“ der Testgetränke auf mikrobielle Fermentationsvorgänge im Colon und sollte weitere Informationen zur *in vivo*-Metabolisierung von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU liefern. Die Bestimmung von p-Kresol im Urin, des pH-Wertes, der kurzkettigen Fettsäuren und der Gesamtkeimzahl im Stuhl war hierbei nicht vorgesehen. Für die Daten der Humanstudie II wurden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt und dargestellt. Außerdem werden die individuellen Daten der 10 Versuchspersonen aufgezeigt. Tabelle 4-9 zeigt eine Übersicht der bestimmten Parameter. Wie in Humanstudie I wurden die einzelnen Urinfraktionen zur Darstellung der ^{13}C und ^{15}N -Ausscheidung nach Aufnahme von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU in eine 0-6 h und eine 6-24 h Urinfraktion zusammengefasst.

Tab. 4-9 Ergebnisübersicht zu Humanstudie II (MW \pm SD, n=10)

Parameter	Nüchtern ¹	Smoothie 1	Smoothie 2	Saft 1	Saft 2
^{13}C Atem T_{\max} [h:min]	11:49 $\pm 05:50$	12:41 $\pm 07:58$	09:14 $\pm 05:21$	10:15 $\pm 05:54$	12:08 $\pm 07:19$
^{13}C Urin, 0-6 h ² [% Dosis]	12,3 $\pm 5,89$	1,7 $\pm 1,16$	2,3 $\pm 1,06$	1,8 $\pm 1,14$	1,4 $\pm 0,52$
^{13}C Urin, 6-24 h [% Dosis]	23 $\pm 14,24$	4,3 $\pm 2,36$	3,4 $\pm 1,17$	3,4 $\pm 1,84$	3,1 $\pm 1,52$
^{15}N Urin, 0-6 h [% Dosis]	8,7 $\pm 7,02$	2,5 $\pm 1,43$	4,6 $\pm 2,32$	2,2 $\pm 1,4$	2,1 $\pm 1,66$
^{15}N Urin, 6-24 h [% Dosis]	22,6 $\pm 17,02$	12,7 $\pm 3,95$	14,8 $\pm 7,21$	13 $\pm 7,39$	12,7 $\pm 7,92$

¹ Angabe der Intervention: Nüchtern = 500 mg ^{13}C -LU + $^{15}\text{N}_2$ -LU, Smoothie = 500 mg ^{13}C -LU + $^{15}\text{N}_2$ -LU + Smoothie, Saft = 500 mg ^{13}C -LU + $^{15}\text{N}_2$ -LU + Saft

² Zeiten für Urinsammlungen nach Aufnahme von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU und dem jeweiligen Testgetränk

4.2.1 $^{13}\text{CO}_2$ in Atemgasproben

Die $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofile variierten stark zwischen den 10 Probanden/-innen und wurden durch die Saftzufuhr intraindividuell beeinflusst. Daher lassen sich die Versuchspersonen nicht wie in Humanstudie I eindeutig anhand der maximalen $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas

(T_{\max}) nach Jackson *et al.* (1999) in die drei Gruppen $^{13}\text{CO}_2\text{-}T_{\max}$ 9-13 h, 15-16 h oder >16 h einteilen (Tab. 4-10, Abb. 4-21). Einerseits wird durch die Zufuhr der Säfte $^{13}\text{CO}_2\text{-}T_{\max}$ teilweise so stark beeinflusst, dass die Zuordnung in zwei Gruppen möglich wäre (Versuchspersonen 4, 6, 9, 10), andererseits weist ein Großteil der Versuchspersonen eine maximale $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung von <9 h auf (Versuchspersonen 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10), sodass diese keine der o.g. Gruppen zuzuordnen wären (Tab. 4-10, Abb. 4-21).

Auffällig erscheint, dass die Zufuhr eines der Testgetränke gegenüber den nüchternen Bedingungen in den meisten Fällen zu früherer (Versuchsperson 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10), vereinzelt aber auch zu wesentlich späterer (Versuchsperson 4 SM 1, Versuchsperson 6 SM 1, SA 1, SA 2) maximaler $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas führte (Tab 4-10, Abb. 4-21). Versuchsperson 5 zeigt nur nach erstmaliger Zufuhr des Saftes (SA 1) eine etwas frühere maximale $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas gegenüber alleiniger Zufuhr des Markers. Ansonsten wird $^{13}\text{CO}_2\text{-}T_{\max}$ hier durch die Zufuhr der Testgetränke etwas verzögert (Tab. 4-10, Abb. 4-21).

Tab. 4-10 Zeitpunkt der maximalen $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung (T_{\max}) im Atemgas der Versuchspersonen aus Humanstudie II (grau hinterlegt = frühere $^{13}\text{CO}_2\text{-}T_{\max}$ bei Zufuhr der Testgetränke)

$T_{\max}^{13}\text{CO}_2$ Atem [h:min]					
Proband/-in	Nüchtern ¹	SM 1	SM 2	SA 1	SA 2
1	9:05	07:15	07:15	07:55	08:25
2	13:06	09:58	10:35	07:30	10:10
3	14:00	08:20	07:04	08:15	10:20
4	15:00	24:28	11:20	09:10	16:14
5	7:00	09:10	10:40	06:15	08:45
6	8:00	23:30	07:30	15:00	26:17
7	7:00	05:15	06:10	07:00	05:25
8	7:00	03:00	03:40	04:53	04:00
9	26:00	22:40	22:46	14:50	22:35
10	13:00	5:20	5:20	11:50	8:13
MW ± SD	11:49 ± 05:50	12:41 ± 07:58	09:14 ± 05:21	10:15 ± 05:54	12:08 ± 07:19

¹ Angabe der Intervention: Nüchtern = 500 mg ^{13}C -LU + $^{15}\text{N}_2$ -LU, SM = 500 mg ^{13}C -LU Smoothie, SA = 500 mg ^{13}C -LU + Saft

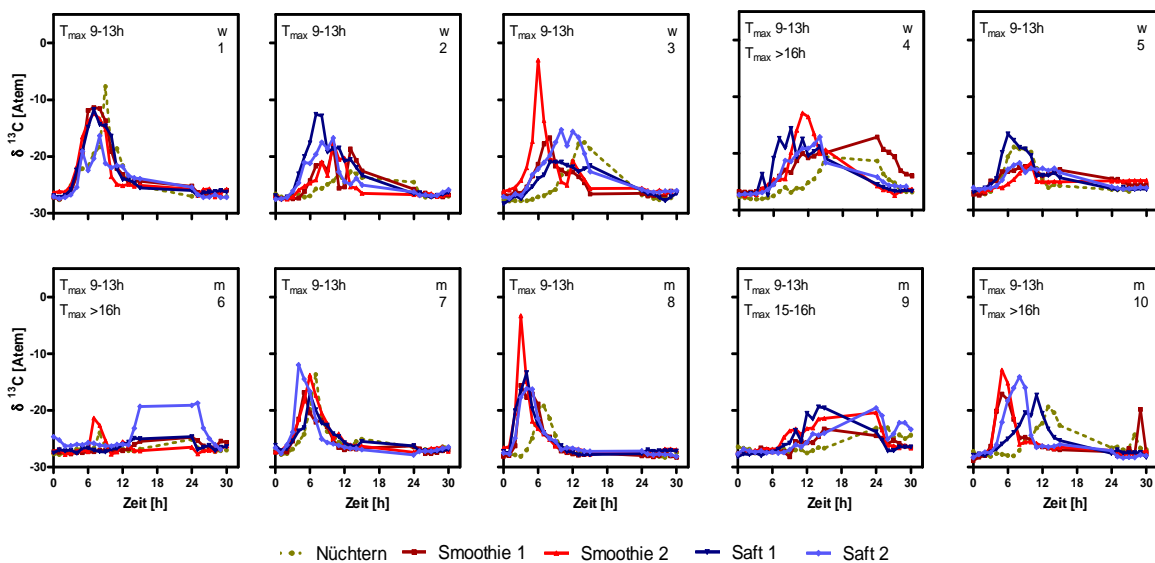


Abb. 4-21 $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofile der Versuchspersonen aus Humanstudie II nach der Markerverabreichung (500 mg ^{13}C -LU) „nüchtern“ und nach der Aufnahme von Smoothie (500 mg ^{13}C -LU + Smoothie 1 + Smoothie 2) bzw. Saft (500 mg ^{13}C -LU + Saft 1 + Saft 2) an den Messtagen in der Dimension „ $\delta^{13}\text{C}$ “ (m = männlich, w = weiblich)

4.2.2 Renale ^{13}C -Exkretion

Die kumulative ^{13}C -Ausscheidung im Urin bis 24 Stunden nach Aufnahme von ^{13}C -LU nüchtern und zusammen mit den Testgetränken variierte stark zwischen den Probanden/-innen und betrug 0-83 % der verabreichten ^{13}C -Dosis. Bei allen Studienteilnehmenden war die renale ^{13}C -Ausscheidung ohne Zufuhr eines der Testgetränke deutlich höher (Abb. 4-22, Tab. 4-11). Besonders auffällig erscheint mit ca. 83 % der verabreichten ^{13}C -Dosis die Ausscheidung der Probandin 5 unter „nüchternen“ Bedingungen.

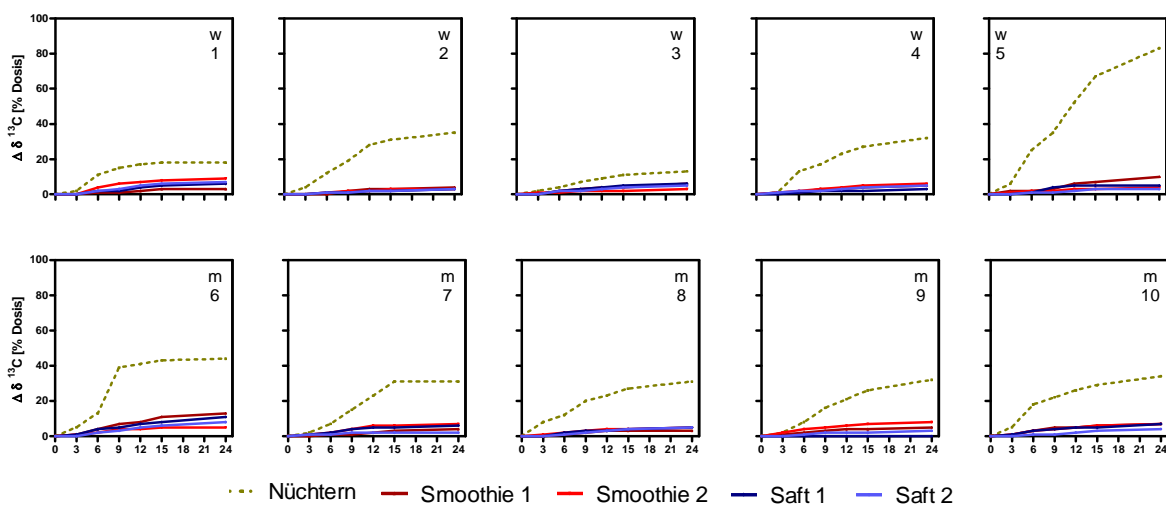


Abb. 4-22 Kumulative renale ^{13}C -Ausscheidung (% Dosis) der Versuchspersonen aus Humanstudie II nach der Markerverabreichung (500 mg ^{13}C -LU) und der Aufnahme von Smoothie (500 mg ^{13}C -LU + Smoothie 1 + Smoothie 2) bzw. Saft (500 mg ^{13}C -LU + Saft 1 + Saft 2) (m = männlich, w = weiblich)

Im Mittel betrug die renale ^{13}C -Ausscheidung in der 0-6 h nach der Markerverabreichung gesammelten Urinfraktion „nüchtern“ $12,4 \pm 5,8$ % und in der von 6-24 h gesammelten Urinfraktion $22,9 \pm 14,4$ % der verabreichten ^{13}C -Dosis. Bei Zufuhr eines der Testgetränke war die mittlere ^{13}C -Ausscheidung im Urin deutlich geringer und lag zwischen $1,3 \pm 0,5$ % (Saft 2) und $2,4 \pm 1,0$ % (Smoothie 2) im 0-6 h Sammelintervall und im Intervall von 6-24 h zwischen $3,1 \pm 1,3$ % (Saft 2) und $4,3 \pm 2,3$ % (Smoothie 1) der verabreichten Dosis ^{13}C (Tab. 4-11).

Die renale ^{13}C -Ausscheidung in den einzelnen Urinfraktionen variierte besonders stark zwischen den Probanden/-innen bei alleiniger Zufuhr von ^{13}C -LU und lag zwischen 0-26,2 % (Versuchsperson 1 und 7, 15-24 h ↔ Versuchsperson 6, 6-9 h) der verabreichten ^{13}C -Dosis. Bei Zufuhr eines der Testgetränke waren diese Streuungen weniger stark ausgeprägt. Die ^{13}C -Exkretion bewegte sich in den einzelnen über jeweils 3 h bzw. 8 h gesammelten Urinfraktionen (15-24 h) nur zwischen 0-3 % der verabreichten ^{13}C -Dosis (Tab. 4-11).

Tab. 4-11 Kumulative ^{13}C -Exkretion (%Dosis) in den einzelnen Urinfraktionen der Versuchspersonen aus Humanstudie II (MW \pm SD, grau hinterlegt und kursiv = minimal/maximal ermittelte Werte „nüchtern“ bzw. bei Testgetränkezufuhr)

Proband/in/ Urinfraktion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW \pm SD
Nüchtern¹ [% Dosis]											
0-3	2,2	3,6	1,7	1,3	5,8	5,3	1,9	8,5	2,1	5,2	3,8 \pm 2,2
3-6	8,7	8,1	2,6	11,9	19,1	7,3	5,5	3,5	6,3	13,1	8,6 \pm 4,9
6-9	4,1	7,3	2,9	4,0	10,2	26,2	7,4	7,7	7,8	4,1	8,2 \pm 6,7
9-12	2,0	9,3	1,7	6,3	17,2	2,5	7,8	3,7	5,2	3,2	5,9 \pm 4,7
12-15	0,8	3,2	1,8	3,8	14,3	1,5	8,4	3,4	4,2	3,6	4,5 \pm 4,0
15-24	0,0	3,2	2,1	4,6	16,6	1,3	0,0	4,3	6,4	5,3	4,4 \pm 4,8
0-6	10,9	11,7	4,3	13,2	24,9	12,6	7,4	12,0	8,4	18,3	12,4 \pm 5,8
6-24	6,9	23,0	8,5	18,7	58,3	31,5	23,6	19,1	23,6	16,2	22,9 \pm 14,4
Smoothie 1 [% Dosis]											
0-3	0,5	0,1	0,5	0,6	1,6	1,4	0,3	0,3	0,5	0,6	0,6 \pm 0,5
3-6	0,3	0,3	1,5	0,8	0,8	2,5	0,9	0,9	1,1	1,9	1,1 \pm 0,7
6-9	0,5	1,6	1,1	1,2	0,6	2,9	0,2	0,7	1,2	2,0	1,2 \pm 0,8
9-12	1,0	0,6	0,4	0,4	2,9	1,5	0,4	0,7	1,0	0,9	1,0 \pm 0,8
12-15	0,5	0,9	0,6	1,1	1,3	2,2	1,1	0,3	0,6	0,6	0,9 \pm 0,5
15-24	0,2	0,1	2,0	0,6	2,4	2,9	1,4	0,5	0,8	1,1	1,2 \pm 1,0
0-6	0,8	0,4	2,0	1,4	2,4	3,9	1,2	1,2	1,6	2,5	1,7 \pm 1,0
6-24	2,2	3,2	4,1	3,3	7,2	9,5	3,1	2,2	3,6	4,6	4,3 \pm 2,3
Smoothie 2 [% Dosis]											
0-3	0,1	0,4	0,5	0,7	0,5	1,0	1,1	0,8	1,8	1,1	0,8 \pm 0,5
3-6	4,3	0,6	0,8	1,1	1,5	1,1	1,4	1,5	1,9	1,7	1,6 \pm 1,0
6-9	1,5	0,5	0,3	1,3	0,2	1,5	1,5	1,0	1,4	1,6	1,1 \pm 0,5
9-12	0,7	0,4	0,3	1,1	0,5	0,7	1,7	0,5	1,3	0,7	0,8 \pm 0,4
12-15	1,0	0,7	0,3	0,5	0,5	0,4	0,4	0,6	0,7	1,2	0,6 \pm 0,3
15-24	1,0	0,3	0,6	1,0	0,3	0,7	0,9	0,7	1,4	1,2	0,8 \pm 0,4
0-6	4,4	1,0	1,3	1,8	2,0	2,1	2,5	2,3	3,7	2,8	2,4 \pm 1,0
6-24	4,2	1,9	1,5	3,9	1,5	3,3	4,5	2,8	4,8	4,7	3,3 \pm 1,3
Saft 1 [% Dosis]											
0-3	0,1	0,4	0,4	0,3	0,4	0,8	0,8	0,5	0,3	1,0	0,5 \pm 0,3
3-6	1,6	0,4	2,0	0,4	1,0	2,7	1,1	1,0	0,0	2,2	1,2 \pm 0,9
6-9	0,5	0,6	0,5	0,8	2,5	1,7	1,7	1,3	0,1	1,0	1,1 \pm 0,7
9-12	2,0	0,2	1,0	0,3	0,8	1,8	1,2	0,4	0,0	0,6	0,8 \pm 0,7
12-15	0,5	0,6	1,0	0,2	0,2	1,0	0,5	0,8	0,0	0,6	0,5 \pm 0,3
15-24	1,6	1,1	1,4	0,7	0,3	3,0	1,0	0,8	0,0	1,6	1,2 \pm 0,8
0-6	1,7	0,8	2,4	0,7	1,4	3,5	1,9	1,5	0,3	3,2	1,7 \pm 1,0
6-24	4,6	2,5	3,9	2,0	3,8	7,5	4,4	3,3	0,1	3,8	3,6 \pm 1,9
Saft 2 [% Dosis]											
0-3	0,0	0,1	0,4	0,9	0,2	0,3	0,6	0,4	0,4	0,3	0,4 \pm 0,3
3-6	2,2	0,6	1,5	0,9	0,7	1,3	0,5	1,0	0,5	0,4	1,0 \pm 0,6
6-9	0,3	0,5	0,6	0,7	0,5	1,7	0,7	1,1	0,6	0,7	0,7 \pm 0,4
9-12	2,8	0,6	0,4	1,0	0,7	1,5	0,2	0,9	0,6	0,8	1,0 \pm 0,7
12-15	0,3	0,4	1,0	0,5	0,7	1,1	0,1	0,9	0,3	0,6	0,6 \pm 0,3
15-24	0,7	1,1	1,2	1,2	0,2	1,6	0,1	0,5	0,6	1,0	0,8 \pm 0,5
0-6	2,2	0,7	1,9	1,8	0,9	1,6	1,1	1,4	0,9	0,7	1,3 \pm 0,5
6-24	4,1	2,6	3,2	3,4	2,2	5,9	1,1	3,4	2,1	3,1	3,1 \pm 1,3

¹ Angabe der Intervention: Nüchtern = 500 mg ^{13}C -LU + $^{15}\text{N}_2$ -LU, Smoothie 1/2 = 500 mg ^{13}C -LU + Smoothie, SA 1/2 = 500 mg ^{13}C -LU + Saft

4.2.3 Renale ^{15}N -Exkretion

Ähnlich der renalen ^{13}C -Ausscheidung konnten Streubreiten von 0-93 % der verabreichten ^{15}N -Dosis in der renalen ^{15}N -Ausscheidung bis 24 Stunden nach Aufnahme von $^{15}\text{N}_2\text{-LU}$ zwischen den Probanden/-innen gemessen werden (Abb. 4-23, Tab. 4-12). Besonders hoch erscheint auch hier die ^{15}N -Ausscheidung der Probandin 5 „nüchtern“ (Abb. 4-23).

Auffällig erscheinen die z.T. stark ausgeprägten Parallelen in der renalen ^{13}C - und ^{15}N -Ausscheidung, insbesondere unter nüchternen Bedingungen (Vgl. Abb. 4-22 und 4-23, z.B. Versuchspersonen 5, 6). Insgesamt scheint auch hier bei den Versuchspersonen 2, 4, 5, 6, 7 und 9 die ^{15}N -Ausscheidung im Urin bei Zufuhr eines der Testgetränke im Vergleich zum „nüchternen“ Zustand etwas verringert (Abb. 4-23).

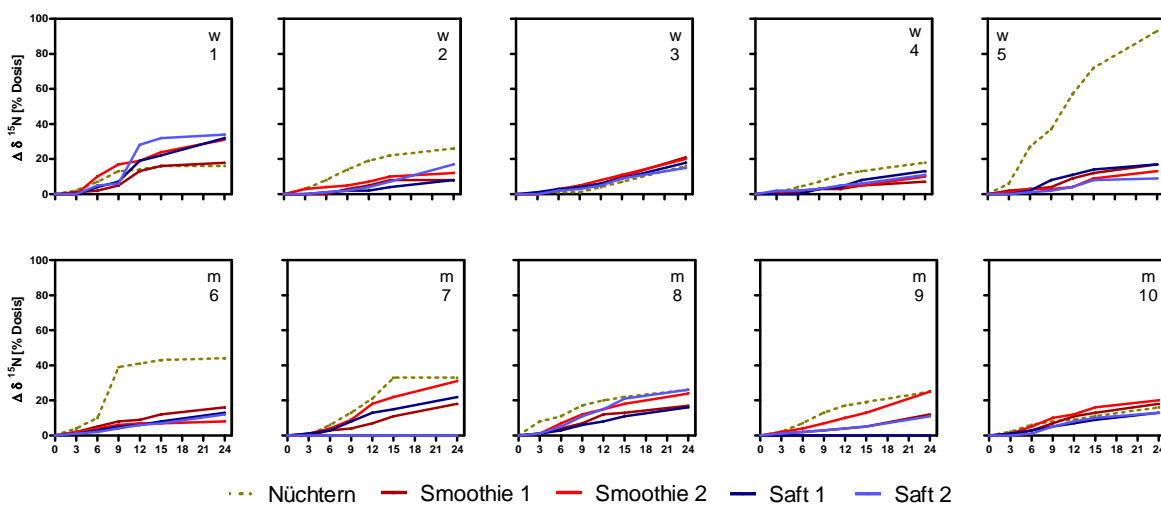


Abb. 4-23 Kumulative renale ^{15}N -Ausscheidung (% Dosis) der Versuchspersonen aus Humanstudie II nach der Markerverabreichung (75 mg $^{15}\text{N}_2\text{-LU}$) nüchtern und nach der Aufnahme von Smoothie (75 mg $^{15}\text{N}_2\text{-LU}$ + Smoothie 1 + Smoothie 2) bzw. Saft (75 mg $^{15}\text{N}_2\text{-LU}$ + Saft 1 + Saft 2) (m = männlich, w = weiblich)

Bei Betrachtung der ^{15}N -Ausscheidung in den einzelnen Urinfraktionen fällt auf, dass wie bei der renalen ^{13}C -Ausscheidung „nüchtern“ besonders große Streuungen zwischen den Probanden/-innen bestehen und im Bereich von 0-28,4 % der verabreichten Dosis ^{15}N lagen (Tab. 4-12). Bei Zufuhr eines der Testgetränke war die ^{15}N -Ausscheidung im Urin insgesamt etwas geringer und variierte weniger stark zwischen den Studienteilnehmenden. Mit Ausnahme der Probandin 1, Messtag „Saft 2“, Urinfraktion 9-12 h, lag die renale ^{15}N -Ausscheidung bei Zufuhr des Smoothies oder Saftes zwischen 0-11,8 % der verabreichten ^{15}N -Dosis (Tab. 4-12). Die mittlere ^{15}N -Ausscheidung im Urin lag „nüchtern“ in der von 0-6 h gesammelten Urinfraktion bei $8,8 \pm 7,0$ und in der von 6-24 h gesammelten Urinfraktion bei $22,4 \pm 17,0$ % der verabreichten ^{15}N -Dosis. Bei Zufuhr des Smoothies oder Saftes verminderte sich die renale ^{15}N -Ausscheidung im Sammelintervall von 0-6 h auf $2,1 \pm 1,6$ bis $4,6 \pm 2,5$ und im Intervall von 6-24 h auf $12,8 \pm 8,0$ bis $14,7 \pm 7,0$ der verabreichten ^{15}N -Dosis (Tab. 4-12).

Tab. 4-12 Kumulative ^{15}N -Exkretion (% Dosis) in den einzelnen Urinfraktionen der Versuchspersonen aus Humanstudie II (MW \pm SD, grau hinterlegt und kursiv = minimal/maximal ermittelte Werte „nüchtern“ bzw. Testgetränkezufuhr)

Proband/in/ Urinfraktion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW \pm SD
Nüchtern [% Dosis]											
0-3	1,8	2,5	1,4	1,0	6,2	3,9	0,3	7,9	1,8	1,7	
3-6	4,9	5,9	0,0	3,4	20,9	6,3	5,5	2,8	5,4	4,7	
6-9	5,8	5,7	0,0	2,9	10,0	28,4	7,0	6,0	5,6	1,4	
9-12	1,6	4,4	2,7	3,3	19,7	2,6	8,6	3,0	4,1	1,5	
12-15	1,7	3,5	3,3	2,5	15,3	1,4	11,4	2,4	2,5	2,2	
15-24	0,0	4,3	8,5	5,0	20,7	1,2	0,0	4,1	5,7	4,4	
0-6	6,7	8,4	1,4	4,4	27,1	10,2	5,8	10,7	7,2	6,4	8,8 \pm 7,0
6-24	9,1	17,9	14,5	13,7	65,7	33,6	27,0	15,5	17,9	9,5	22,4 \pm 17,0
Smoothie 1											
0-3	0,8	0,1	0,2	0,6	1,7	1,6	0,2	0,6	0,5	0,5	
3-6	0,7	0,3	1,4	0,8	1,2	3,0	3,0	3,4	1,6	2,4	
6-9	3,3	2,9	2,0	1,1	0,9	3,0	1,1	3,4	0,9	3,8	
9-12	7,9	1,4	2,0	0,4	5,7	1,7	2,3	4,6	1,2	4,0	
12-15	3,6	2,8	4,4	1,6	2,5	2,5	4,6	1,5	1,1	2,1	
15-24	1,9	0,5	11,2	2,2	5,2	4,6	7,3	4,0	7,0	5,2	
0-6	1,5	0,4	1,6	1,4	2,9	4,6	3,2	4,0	2,1	2,9	2,5 \pm 1,3
6-24	16,7	7,6	19,6	5,3	14,3	11,8	15,3	13,5	10,2	15,1	12,9 \pm 4,3
Smoothie 2											
0-3	0,2	2,7	0,1	0,7	0,9	1,6	1,2	1,5	2,0	0,8	
3-6	10,2	1,1	2,9	0,9	2,2	1,9	2,8	5,7	2,3	4,0	
6-9	6,6	1,4	2,3	1,2	0,2	2,0	5,1	4,8	2,2	4,8	
9-12	1,7	1,5	3,0	1,2	0,8	1,0	9,4	2,6	3,6	2,2	
12-15	5,0	3,5	2,7	1,3	4,6	0,5	3,7	3,3	3,2	4,1	
15-24	6,9	1,8	8,5	4,5	4,2	1,2	8,9	5,7	11,7	4,3	
0-6	10,4	3,8	3,0	1,6	3,1	3,5	4,0	7,2	4,3	4,8	4,6 \pm 2,5
6-24	20,2	8,2	16,5	8,2	9,8	4,7	27,1	16,4	20,7	15,4	14,7 \pm 7,0
Saft 1											
0-3	0,1	0,3	0,5	0,2	0,5	0,7	1,0	0,8	0,2	1,1	
3-6	3,9	0,5	2,4	0,2	1,7	2,6	2,0	2,2	0,0	2,1	
6-9	3,3	0,8	0,9	2,4	5,9	1,6	5,2	3,5	0,0	2,0	
9-12	11,8	0,6	2,3	1,7	3,2	1,6	4,9	1,2	0,0	1,9	
12-15	3,3	1,9	2,8	3,1	2,5	1,1	2,3	3,0	0,0	1,9	
15-24	10,0	4,2	8,7	5,2	3,6	5,7	7,1	4,9	0,0	4,3	
0-6	4,0	0,8	2,9	0,4	2,2	3,3	3,0	3,0	0,2	3,2	2,3 \pm 1,3
6-24	28,4	7,5	14,7	12,4	15,2	10,0	19,5	12,6	0,0	10,1	13,0 \pm 7,5
Saft 2											
0-3	0,0	0,0	0,1	1,5	0,3	0,6	0,4	0,7	0,9	0,3	
3-6	4,8	0,9	1,6	0,8	0,6	1,4	0,0	4,4	0,9	1,0	
6-9	1,1	1,0	1,5	0,9	1,1	2,1	0,0	5,7	0,8	4,0	
9-12	21,6	2,4	1,7	1,8	2,4	1,7	0,0	4,6	1,2	2,8	
12-15	4,4	2,8	4,2	1,3	3,3	1,5	0,0	5,4	1,1	2,0	
15-24	2,5	10,3	5,8	4,6	1,3	4,9	0,0	4,8	6,2	3,4	
0-6	4,8	0,9	1,7	2,3	0,9	2,0	0,4	5,1	1,8	1,3	2,1 \pm 1,6
6-24	29,6	16,5	13,2	8,6	8,1	10,2	0,0	20,5	9,3	12,2	12,8 \pm 8,0

¹ Angabe der Intervention: Nüchtern = 500 mg ^{13}C -LU + $^{15}\text{N}_2$ -LU, Smoothie 1/2 = 500 mg ^{13}C -LU + Smoothie, SA 1/2 = 500 mg ^{13}C -LU + Saft

Für Humanstudie II lässt sich festhalten, dass die $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofile und die renale ^{13}C - und ^{15}N -Ausscheidung nach Aufnahme von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU stark zwischen den Versuchspersonen variierte. Bei einigen Versuchspersonen wurde die maximale $^{13}\text{CO}_2$ - T_{\max} bei gleichzeitiger Zufuhr der Testgetränke deutlich früher, vereinzelt aber auch später erreicht. Bei Zufuhr der Testgetränke verminderte sich bei allen Versuchspersonen die kumulative ^{13}C -Ausscheidung im Urin, während sich die renale ^{15}N -Ausscheidung nur bei 6 Versuchspersonen verringerte. Auffällig erscheinen die teilweise stark ausgeprägten parallelen Verläufe der ^{13}C - und ^{15}N -Ausscheidung im Urin, insbesondere unter nüchternen Bedingungen.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, Erkenntnisse über die Metabolisierung von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU nach oraler Aufnahme der ^{13}C - und $^{15}\text{N}_2$ -markierten Substanzen zu erlangen sowie mit diesen Markern mikrobielle Stoffumsetzungen im menschlichen Colon unter dem Einfluss von nutritiv zugeführten Anthocyanen zu untersuchen. Die beiden Marker ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU wurden bisher in mehreren Studien zur Untersuchung der intestinalen Mikrobiota und ernährungsbedingter Einflüsse wie z.B. Prä- oder Probiotika eingesetzt; sie scheinen hierfür nach den vorliegenden Publikationen geeignet zu sein [Cloetens *et al.*, 2008; De Preter *et al.*, 2007; Geboes *et al.*, 2005; Wutzke *et al.*, 2010]. Als Parameter dienten auf die Markierung zurückzuführende Isotope sowie Metabolite, die beim mikrobiellen Stoffwechsel des Dickdarms entstehen und über verschiedene Wege ausgeschieden werden. Bestimmt wurden

- $^{13}\text{CO}_2$ im Atemgas
- die Gesamtausscheidung von ^{13}C , ^{15}N sowie von p-Kresol im Urin
- der pH-Wert sowie die kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat sowie Isobutytrat, Isovalerat und Valerat
- die Gesamtkeimzahl im Stuhl.

In zwei Humanstudien sollte dabei untersucht werden, ob eine „langfristige“ und „kurzfristige“ Zufuhr von Anthocyanen aus verschiedenen Testgetränken Einfluss auf mikrobielle Fermentationseigenschaften und die Metabolisierung von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU im Colon ausüben. Als langfristig wurden mögliche Einflüsse bezeichnet, die sich nach täglicher Aufnahme der Testsubstanzen über 14 Tage ergeben könnten (Humanstudie I). Als kurzfristig wurden Einflüsse angesehen, die nach einmaliger Aufnahme der Testsubstanzen auftreten könnten (Humanstudie II). Dabei erschien es wichtig, dass möglichst nur die Einflüsse der eingesetzten Testsubstanzen zum Tragen kamen. Beide Studien wurden daher weitestgehend „standardisiert“. Es gab Ernährungsvorschriften für die Probanden/-innen, einheitliche Applikationsverfahren für die Testsubstanzen und Marker, detaillierte Regeln für die Probennahmen und standardisierte analytische Methoden zur Messung der Untersuchungsparameter. Die Standardisierung war dringend erforderlich, da die täglich aufgenommenen Mengen und Arten von Nährstoffen und deren Umsetzung im intestinalen und intermediären Stoffwechsel zwischen Individuen naturgemäß stark variieren können.

5.1 Studiendesign

5.1.1 Probandinnen

Humanstudie I

Um die Variation individueller Stoffwechseleigenschaften beim Menschen gering zu halten, sollte für die Humanstudie I ein möglichst homogenes Probandenkollektiv untersucht werden. Die 30 ausgewählten gesunden Studentinnen der Ernährungswissenschaften im Alter von 23-27 Jahren waren gesund, die Werte für den BMI lagen im Bereich von 18,2-28,0 kg/m². Bis auf drei Probandinnen, die einen BMI von >25 kg/m² aufwiesen und damit nach der World Health Organization (WHO) als übergewichtig gelten und eine untergewichtige Probandin mit einem BMI von <18,5 kg/m², lag der BMI aller Probandinnen zwischen 18,5-24,9 kg/m² und damit im Bereich „Normalgewicht“ [WHO, 2004]. Das Probandinnenkollektiv war insgesamt deutlich größer und homogener als in anderen Studien mit dem Einsatz von ¹³C-LU und/oder ¹⁵N₂-LU, in denen zwischen 10-20 Personen im Alter von 20-45 Jahren als Kollektiv dienten [Cloetens *et al.*, 2008; De Preter *et al.*, 2004; Wutzke *et al.*, 2010]. Hinsichtlich der untersuchten Parameter wie ¹³CO₂ im Atemgas, ¹³C, ¹⁵N und p-Kresol im Urin sowie kurzkettigen Fettsäuren und dem pH-Wert im Stuhl ist in bisherigen Studien von keinem Einfluss des Geschlechts oder des Alters berichtet worden [Cloetens *et al.*, 2008; De Preter *et al.*, 2004; Walton *et al.*, 2012; Wutzke *et al.*, 2010]. Insbesondere zur Umsetzung von ¹⁵N₂-LU gibt es Hinweise, dass kaum interindividuelle Unterschiede bei der Metabolisierung bestehen, sobald das Lactoseureid das Colon erreicht hat [Geboes *et al.*, 2005]. Verschiedene ¹⁵N-Exkretionsprofile im Urin nach oraler Aufnahme von ¹⁵N₂-LU resultieren demnach eher aus abweichenden orozökalen Transitzeiten zwischen Individuen. Die mit den 30 Probandinnen der vorliegenden Studie erzielten Ergebnisse können daher als repräsentativ angesehen werden.

Allerdings sollte bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass große inter- wie auch intraindividuelle Unterschiede in der Zusammensetzung und metabolischen Aktivität der intestinalen Mikrobiota bestehen können, d.h. letztere und deren Metabolite sehr wirtsspezifisch ausgeprägt sein können [De Preter *et al.*, 2004; Eckburg *et al.*, 2005; Flint, 2012; Tuovinen *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2011].

Humanstudie II

Das Probandenkollektiv der Humanstudie II kann mit 5 weiblichen und 5 männlichen Studierenden der Ernährungswissenschaften im Alter von 23-27 Jahren ebenfalls als relativ homogen und vergleichbar mit den Probandinnen aus Humanstudie I gelten.

Compliance der Probandinnen

Alle Personen nahmen bis zum Ende der beiden Studien teil. Dabei wurden sowohl die Ernährungsvorschriften wie auch Regeln zur Probennahme und oralen Aufnahme von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU an den Messtagen eingehalten. Durch eine Fallzahlberechnung vor Beginn der Studien lag ausreichendes Probenmaterial vor, um aussagekräftige Ergebnisse erhalten zu können.

5.1.2 Testgetränke

Sowohl der Traube-Heidelbeer-Saft als auch der Traube-Heidelbeer-Smoothie unterschieden sich im Anthocyangehalt mit 840,9 mg/l und 983,7 mg/l deutlich vom Traube-Heidelbeer-Placebosaft. So wurden täglich mit 330 ml Saft 277 mg, mit gleicher Flüssigkeitsmenge Smoothie 325 mg und mit dem Placebo 3 mg Anthocyane aufgenommen (Tab. 3-1). Damit lag die tägliche Anthocyanaufnahme während der Interventionsabschnitte „Saft“ und „Smoothie“ deutlich über der durchschnittlich geschätzten Aufnahme von 2,7 mg pro Tag mit einer Schwankungsbreite von 0-76 mg in Deutschland und von 12,5 mg pro Person und Tag in den USA [Watzl *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2006]. Unterschiedliche Mengen wie auch Darreichungsformen von Anthocyanen zur Untersuchung ihrer Bioverfügbarkeit und Wirkung auf die intestinale Mikrobiota erschweren einen Vergleich von publizierten Daten mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Die in verschiedenen Studien eingesetzten Anthocyanmengen variierten zwischen ca. 56-1900 mg und wurden als Getränk, Extrakt, ganze Frucht oder Konzentrat verabreicht [McGhie, Walton 2007; Queipo-Ortuño *et al.*, 2012; Vendrame *et al.*, 2011]. Wichtiger erscheint daher, dass mit der vorliegenden Studie das Ziel einer anthocyanreichen Intervention in Form von Saft und Smoothie im Vergleich zu einer anthocyanarmen Intervention mit dem Placebosaft erreicht wurde.

Außerdem wurden beim Verzehr von jeweils 300 ml mit Saft 2,31 g, mit Smoothie 3,63 g und mit Placebo 1,32 g Ballaststoffe aufgenommen (Tab. 3-1). Die Testgetränke lieferten somit nur einen geringen Beitrag zu der von der DGE empfohlenen Menge von 30 g pro Tag und Person. Da einerseits der Ballaststoffgehalt der Testgetränke insgesamt sehr gering war und andererseits diesbezüglich nur geringe Unterschiede zwischen den Testgetränken bestanden, scheint eine Bewertung/Einteilung der Testgetränke in ballaststoffreich und -arm kaum sinnvoll. In zukünftigen Untersuchungen mit ähnlicher Fragestellung wäre daher zu empfehlen, Testgetränke oder Darreichungsformen mit stärker differierenden Ballaststoffgehalten einzusetzen.

Mit ca. 200 kcal, hauptsächlich in Form von Glucose und Fructose, lieferten die Testgetränke ca. 10 % der nach DGE für die untersuchte Personengruppe empfohlenen täglichen Energiezufuhr [DACH, 2012].

Beurteilung der Testgetränke durch Probandinnen der Humanstudie I

Alle Testgetränke wurden nach Aussagen der Probandinnen gut vertragen. Allerdings soll der Smoothie in Einzelfällen zu Unwohlsein und/oder leichten Magen-Darm-Beschwerden geführt haben. Außerdem empfanden einige Probandinnen die Aufnahme von 330 ml eines Testgetränks nüchtern am Morgen als unangenehm. Im Anschluss an Humanstudie I sollten die Probandinnen die Testgetränke hinsichtlich der Bekömmlichkeit und des Geschmacks von „sehr gut“ bis „sehr schlecht“ beurteilen. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 5-1 dargestellt.

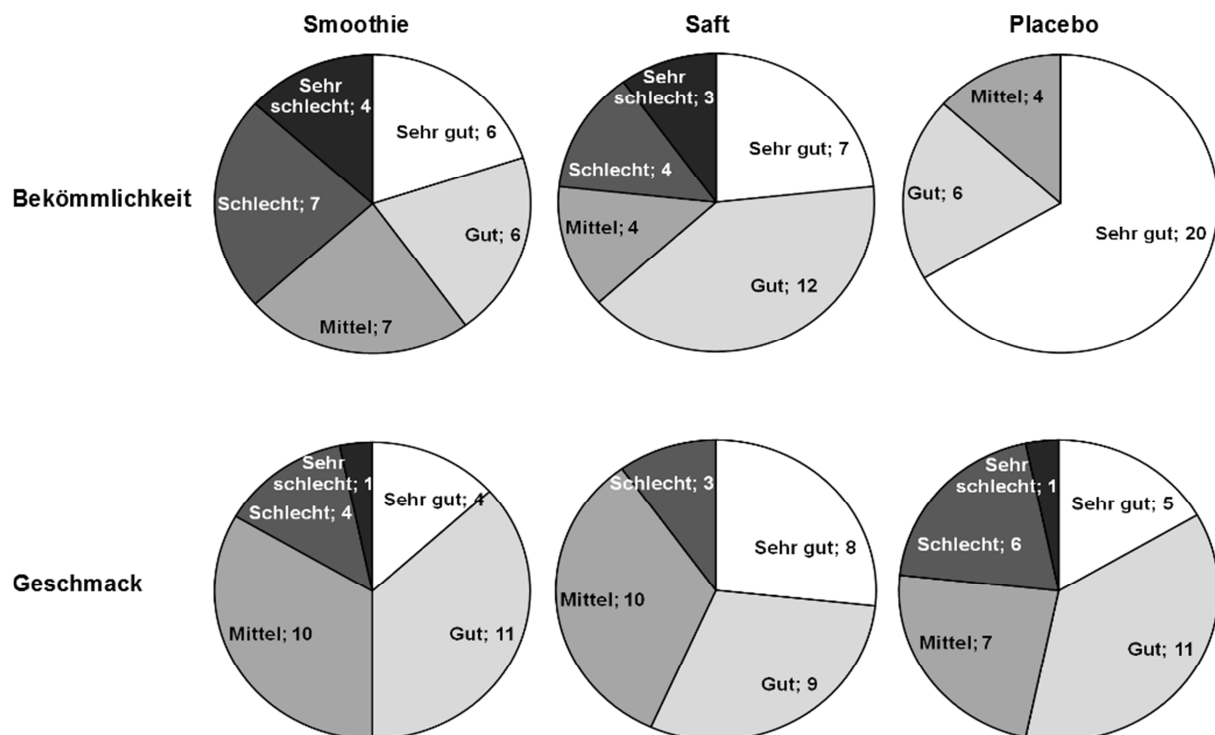


Abb. 5-1 Subjektive Beurteilung der Bekömmlichkeit und des Geschmacks der Testgetränke durch Probandinnen der Humanstudie I (n = 30)

Insbesondere schien danach der Placebo für die Probandinnen sehr bekömmlich zu sein, während sowohl der Smoothie als auch der Saft von 11 bzw. 7 Probandinnen als schlecht bis sehr schlecht bekömmlich beurteilt wurde. Der Geschmack aller drei Testgetränke wurde von etwa der Hälfte der Probandinnen als sehr gut und gut empfunden.

5.1.3 Dauer der Washout- und Interventionsabschnitte

Die intestinale Mikrobiota des Menschen ist ein sehr dynamisches Ökosystem, welches schnell auf sich ändernde Bedingungen wie z.B. eine Nährstoffzufuhr reagieren kann [Chow *et al.*, 2010; David *et al.*, 2013]. In den wenigen Humanstudien, die Einflüsse und Wechselwirkungen von Anthocyanen mit der intestinalen Mikrobiota des Menschen untersuchten, variierten Washout- und Interventionsabschnitte zwischen mehreren Tagen bis

mehreren Wochen [Jiménez-Girón *et al.*, 2013; Queipo-Ortuño *et al.*, 2012; Tzounis *et al.*, 2011].

Dagegen wurde in *in vitro*-Versuchen die Umsetzung und der Einfluss von Anthocyanen und Polyphenolen auf die Zusammensetzung und Aktivität der fäkalen Mikrobiota meist über Zeiträume von mehreren Stunden bis wenigen Tagen untersucht [Aura *et al.*, 2005; Gross *et al.*, 2010; Sánchez-Patán *et al.*, 2012].

In der vorliegenden Studie sollte der Einfluss von Anthocyanen auf die Mikrobiota des Menschen mit ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU untersucht werden. In anderen Humanstudien mit $^{15}\text{N}_2$ -LU zu Effekten von Pro- und Präbiotika auf die Fermentation im Colon wurden meist Interventionszeiträume von 2-4 Wochen gewählt [De Preter *et al.*, 2004; De Preter *et al.*, 2007; Cloetens *et al.*, 2008]. In einer Studie von Wutzke *et al.* (2010) traten nach 10 Tagen Intervention mit Pro- und Präbiotika Änderungen der ^{15}N -Ausscheidung im Urin und Stuhl der Versuchspersonen auf.

Die 10-tägigen Washout- und 14-tägigen Interventionsabschnitte der Humanstudie I und die 7-tägigen Washoutabschnitte in Humanstudie II dürften demnach ausreichend lang gewesen sein. Sie waren aus dieser Sicht auch gut praktisch durchführbar und für die Versuchspersonen akzeptabel.

5.2 ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU

Im Folgenden werden die Ergebnisse zu ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU diskutiert. In Abbildung 5-2 ist zur Veranschaulichung eine vereinfachte, schematische Darstellung des intestinalen ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU Stoffwechsels gezeigt.

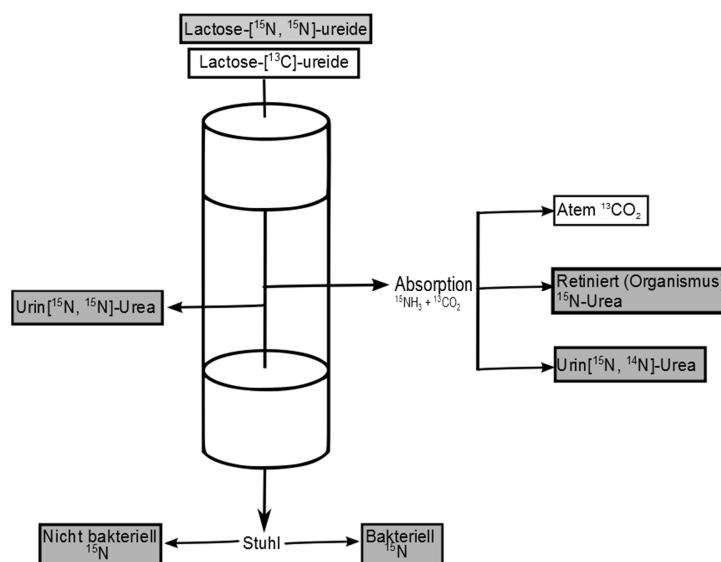


Abb. 5-2 Stoffwechselweg des Lactoseureids: Oral appliziertes ^{13}C - und $^{15}\text{N}_2$ -markiertes Lactoseureid wird im Colon durch die intestinale Mikrobiota gespalten. Die Wiederfindungsrate von ^{13}C im Atem und ^{15}N im Urin dient als Marker für mikrobielle Prozesse im Colon [modifiziert nach Jackson *et al.*, 1999].

5.2.1 $^{13}\text{CO}_2$ in Atemgasproben

Bisher gibt es nur wenige Studien, in denen zur Untersuchung mikrobieller Fermentationseigenschaften im Colon des Menschen die $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung nach Aufnahme von ^{13}C -LU untersucht wurde. Die meisten Studien zielten darauf ab, ^{13}C -LU als diagnostischen Marker zur Bestimmung der oroökalen Transitzeit oder einer bakteriellen Über- bzw. Fehlbesiedlung im Dünndarm einzusetzen [Berthold *et al.*, 2009; Wutzke *et al.*, 1997; Wutzke, Mix 2010] und nutzten die Fähigkeit intestinaler Bakterien, ^{13}C -LU umzusetzen. Dabei war die Mikrobiota selbst kein direktes Untersuchungsziel. In der vorliegenden Arbeit sollte mit dem Einsatz von ^{13}C -LU als Marker anhand der $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofile die Fermentationsaktivität der Mikrobiota unter dem Einfluss der Testgetränke untersucht werden. Gleichzeitig sollten im Zusammenhang mit der renalen ^{13}C - und ^{15}N -Ausscheidung nach oraler Aufnahme von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU Informationen über die intestinale Metabolisierung der markierten Substanzen gewonnen werden.

In Humanstudie I war zunächst die hohe inter- und intraindividuelle Variabilität in den $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofilen auffällig, die keinen langfristigen Einfluss der Testgetränke auf die maximale $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas als Maß für die bakterielle Fermentationsaktivität im Colon erkennen ließen (Tab. 4-1; Abb. 4-1; Abb. 4-2). Große Streuungen in der $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung nach Aufnahme von ^{13}C -LU sind auch in anderen Studien beschrieben worden [Jackson *et al.*, 1999; Morrisson *et al.*, 2003; Wutzke, Mix 2010]. Ausschlaggebend hierfür könnten nach Jackson *et al.* (1999) Unterschiede in der Zusammensetzung und metabolischen Aktivität der Mikrobiota, der bakteriellen Enzymausstattung und -aktivität zur Spaltung von ^{13}C -LU in verschiedenen Abschnitten des Colons sowie zwischen Personen sein. Die Einteilung der Versuchspersonen nach dem Zeitpunkt der maximalen $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas nach Jackson *et al.* (1999) verdeutlicht die großen interindividuellen Unterschiede in der vorliegenden Untersuchung. Gleichzeitig sollten so differenziertere Hinweise zum Einfluss der Testgetränke gewonnen werden, wobei auch auf diesem Weg kein Effekt der Testgetränke auf die $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofile erkennbar war. Für die vorliegende Studie muss daher geschlossen werden, dass die langfristige Zufuhr der verschiedenen Testgetränke über 14 Tage die bakterielle Umsetzung von ^{13}C -LU in eine erkennbare Richtung nicht eindeutig beeinflusste. Zu dieser Schlussfolgerung muss man durch die große inter- wie auch intraindividuelle Variabilität der $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofile kommen.

Eine Besonderheit stellte die Probandin der Humanstudie I dar, die keine $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas aufwies (Abb. 4-2). Da sowohl erhöhte renale ^{13}C - wie auch ^{15}N -Ausscheidungen bei dieser Probandin nachweisbar waren, ist davon auszugehen, dass die Isotope intermediär aufgenommen wurden. Ein zu kurz gewählter Zeitraum der Probennahme kommt kaum in Betracht, denn Daten aus der Literatur zeigen, dass nach

Aufnahme von ^{13}C -LU ca. 35 % der verabreichten ^{13}C -Dosis innerhalb von 24 h über den Atem ausgeschieden wurden [Jackson *et al.*, 1999; Wutzke *et al.*, 1997]. Bisher sind noch keine Fälle ohne $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung in der Literatur bekannt.

Auch eine limitierte bakterielle Umsetzung von ^{13}C -LU bei dieser Probandin ist wenig wahrscheinlich, denn die meisten intestinalen Bakterien verfügen über das Enzym Urease zur Spaltung von Harnstoff [Suzuki *et al.*, 1979]. Möglicherweise wurde demzufolge die Zucker-Harnstoff-Verbindung im Untersuchungszeitraum nicht gespalten, sodass es zu keiner $^{13}\text{CO}_2$ -Freisetzung und -Absorption sowie $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung über die Lunge kam (Abb. 5-2). Die erhöhte ^{13}C - und ^{15}N -Ausscheidung im Urin dieser Probandin könnte demnach auf der Ausscheidung des ungespaltenen Lactose- oder Glucoseureids beruht haben [De Preter *et al.*, 2011; Morrison *et al.*, 2003]. In weitergehenden Untersuchungen wären daher differenzierte Analysen der ^{13}C - und ^{15}N -markierten Ausscheidungsprodukte wie z.B. LU, GU (Glucoseureid) und Harnstoff im Urin und in den Fäzes erforderlich, um festzustellen, inwieweit bei dieser Probandin ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU tatsächlich bakteriell verstoffwechselt wurden.

In Humanstudie II sollte der kurzfristige Einfluss der Testgetränke auf die $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung bzw. intestinale mikrobielle Fermentationsaktivität nach Aufnahme von ^{13}C -LU untersucht werden. Da der Schwerpunkt dieser Studie auf der Untersuchung der Bioverfügbarkeit von Anthocyanen lag, wurde hier kein Placebosaft gegeben. Wie in Humanstudie I variierten die $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofile der 10 Versuchspersonen intra- und interindividuell stark. Die frühere maximale $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas bei mehreren Versuchspersonen bei gleichzeitiger Aufnahme der Testgetränke könnte auf das höhere Substratangebot und daraus resultierender höherer bakterieller Fermentationsaktivität im Vergleich zur „Nüchternaufnahme“ von ^{13}C -LU zurückzuführen sein. Inwieweit die in Smoothie und Saft enthaltenen Anthocyane, polyphenolischen Verbindungen und Ballaststoffe diesen Effekt verursachten, könnte in weiteren Untersuchungen durch die Zufuhr des Placebosaftes mit ^{13}C -LU überprüft werden. Als weitere Ursache für die frühere maximale $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas kommt die gleichzeitige Zufuhr von Nährstoffen und größerem Flüssigkeitsvolumen durch die Testgetränke in Betracht. Hierdurch könnten die Verdauungsprozesse und die intestinale Motilität gesteigert und damit die orozökale Transitzeit beeinflusst worden sein [Pandolf 2008]. Zwar waren die Versuchspersonen bemüht, sich an allen Messtagen „standardisiert“ zu ernähren, dennoch besteht auch hier die Möglichkeit, dass über den Tag geringe, aber doch ausschlaggebende Unterschiede im Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme und der Nahrungszusammensetzung nach Aufnahme des markierten Lactoseureid bestanden. Nach Priebe *et al.* (2004) können diese Faktoren die orozökale Transitzeit maßgeblich beeinflussen. Aus dieser Sicht lässt sich in der vorliegenden Untersuchung der Humanstudie II nicht eindeutig feststellen, ob für die

veränderten $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofile ein „kurzfristig“ höheres Substratangebot durch Zufuhr des Smoothies und Saftes verantwortlich waren oder ob die oroökalen Transitzeiten substratunabhängig kürzer ausfielen.

5.2.2 Renale ^{13}C -Exkretion

Das ^{13}C -Isotop im Harnstoffmolekül von Lactoseureid kann nur durch mikrobielle Spaltung als $^{13}\text{CO}_2$ freigesetzt werden. Das nach oraler ^{13}C -LU-Aufnahme renal ausgeschiedene C-Isotop dürfte demzufolge aus mikrobiell nicht vollständig zu $^{13}\text{CO}_2$ umgesetztem Lactoseureid stammen (Abb. 5-2). Bei Kenntnis dieser renalen ^{13}C -Ausscheidung lässt sich wiederum der Anteil des mikrobiell vollständig bis zu $^{13}\text{CO}_2$ abgebauten Lactoseureids abschätzen. Früheren Untersuchungen zufolge werden ca. 80 % der oral verabreichten ^{13}C -LU-Dosis über den Atem und innerhalb von 3 Tagen weniger als 2 % der verabreichten ^{13}C -Dosis bakteriell zu ^{13}C -Harnstoff umgesetzt und in dieser Form über den Urin ausgeschieden [Jackson *et al.*, 1999; Morrison *et al.*, 2003]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Atemgasproben nicht quantitativ gesammelt, sodass diesbezüglich keine Aussage getroffen werden kann. In Humanstudie I lag die mittlere renale ^{13}C -Ausscheidung innerhalb des gesamten 30 h Sammelzeitraums zwischen 13,7-15,6 % (Summe aus einzelnen Urinfraktionen „Nach SM“ und „Vor SA“) der verabreichten ^{13}C -Dosis, wobei im letzten Sammelintervall von 24-30 h weniger als 1 % auftraten (Tab. 4-2). Vergleichbare Werte von ca. 13-15 % der verabreichten ^{13}C -Dosis wurden von Wutzke *et al.* (1997) und Morrison *et al.* (2003) gefunden. Diese beiden letztgenannten Ergebnisse stammen aus den bisher einzigen Studien, in denen die ^{13}C -Ausscheidung im Urin nach Aufnahme von ^{13}C -LU bestimmt wurde. Aufgrund der mit den eigenen Messungen gut übereinstimmenden Ergebnisse zur renalen ^{13}C -Ausscheidung kann davon ausgegangen werden, dass in Humanstudie I der Großteil ^{13}C über den Atem ausgeschieden wurde.

Auch bei den meisten Versuchspersonen aus Humanstudie II lagen die Nüchternwerte der renalen ^{13}C -Ausscheidung in der 0-6 und 6-24 h Urinfraktion zwischen ca. 4-18 % bzw. ca. 7-24 % der verabreichten ^{13}C -Dosis und damit in der Größenordnung der Werte der Probandinnen aus Humanstudie I (Vgl. Tab. 4-11, Tab. A-1, Tab. A-2).

Die renale ^{13}C -Ausscheidung einzelner Probandinnen aus Humanstudie I war in der von 0-6 und von 6-24 h gesammelten Urinfraktion mit bis zu 25 bzw. 29 % der verabreichten ^{13}C -Dosis allerdings deutlich über dem Mittel aller Messungen für diese Fraktionen (Abb. 4-4, Abb. 4-5, Tab. A-1, Tab. A-2). Auch die Probandin 5 der Humanstudie II wies mit ca. 25 bzw. 58 % der verabreichten Dosis ^{13}C sehr hohe renale ^{13}C -Ausscheidungswerte in den genannten Urinfraktionen auf. In diesen Fällen dürfte demnach eine geringere $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung und damit eine verminderte bakterielle Fermentationsaktivität im Colon vorgelegen haben, wobei dies anhand der Atemgaszeitprofile nicht eindeutig erkennbar ist.

Allerdings könnte die geringere und verzögerte maximale $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas einzelner Versuchspersonen aus Humanstudie II auf eine verringerte Aktivität der Colonbakterien unter „nüchternen“ Bedingungen hinweisen (Abb. 4-21, Tab. 4-10).

Die grafische Darstellung der ^{13}C -Urinzeitprofile der Versuchspersonen aus Humanstudie II verdeutlicht, dass bei allen Versuchspersonen der Höhepunkt der ^{13}C -Ausscheidung, besonders gut erkennbar im Zustand „nüchtern“, 3-6 oder 6-9 h nach der Markeraufnahme erreicht wurde (Abb. 5-3, Tab. 4-11). Die renale ^{13}C -Ausscheidung stieg schon im Sammelintervall 0-3 h und damit vor der ersten $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas an (Vgl. Abb. 5-3 und Abb. 4-21). Die gleiche Beobachtung machten bereits Morrison *et al.* (2003) und Wutzke *et al.* (1997). Die frühe ^{13}C -Anreicherung im Urin kann demnach nicht auf einer bakteriellen Metabolisierung von ^{13}C -LU beruhen. Vielmehr ist anzunehmen, dass ^{13}C -LU im Dünndarm durch Lactase zu Glucose- ^{13}C -Ureid gespalten und dann in dieser Form absorbiert und über den Urin ausgeschieden wurde [Morrison *et al.*, 2003; Wutzke *et al.*, 1997]. Neuere Untersuchungen zum Metabolismus von $^{15}\text{N}_2$ -LU zeigen, dass Glucose- ^{15}N -Ureid bis 24 h und die höchsten Mengen im Sammelintervall von 3-6 h nach Aufnahme des Markers renal ausgeschieden wurden [De Preter *et al.*, 2011]. Deshalb spiegelt wahrscheinlich auch die in der vorliegenden Arbeit festzustellende frühe ^{13}C -Anreicherung im Urin die Ausscheidung von Glucose- ^{13}C -Ureid wider.

Demnach könnte die bei Zufuhr der Testgetränke in Humanstudie II auf maximal ca. 9 % der verabreichten Dosis deutlich verminderte renale ^{13}C -Ausscheidung auf eine höhere Ausscheidung von ^{13}C über den Atem und damit eine höhere bakterielle Umsetzung von ^{13}C -LU hindeuten (Tab. 4-11, Smoothie 1, Versuchsperson 6, 6-24 h).

Bei Zufuhr der Testgetränke sind neben der insgesamt wesentlich geringeren ^{13}C -Ausscheidung die Unterschiede im Vergleich zur alleinigen Aufnahme von ^{13}C -LU („nüchtern“) in der ^{13}C -Anreicherung der verschiedenen Urinfraktionen weniger stark ausgeprägt (Tab. 4-11). Dies könnte analog zur Erklärung der früheren $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung auf einem beschleunigten orozökalen Transit von ^{13}C -LU durch Zufuhr der Testgetränke beruhen. Demzufolge wurde ein geringerer Anteil des verabreichten ^{13}C -LU im Dünndarm gespalten und als ^{13}C -GU absorbiert und renal ausgeschieden. Somit könnte dann ein größerer Anteil des oral aufgenommenen ^{13}C -LU schneller in das Colon gelangt sein, wo es bakteriell umgesetzt und schließlich in Form von $^{13}\text{CO}_2$ vermehrt über den Atem ausgeschieden wurde. Zum Nachweis und zur quantitativen Bilanzierung einer solchen durch die Testgetränke verursachten Verschiebung von renaler ^{13}C -Ausscheidung zu vermehrter $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung könnten Analysen von ^{13}C -Glucoseureid (^{13}C -GU), ^{13}C -LU und ^{13}C -Harnstoff im Urin und zusätzlich die quantitative Erfassung der $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung dienen. Außergewöhnlich und schwer erklärbar erscheint die sehr hohe ^{13}C -Ausscheidung in allen Urinfraktionen der Probandin 5 im Zustand „nüchtern“ (Tab. 4-11, Abb. 5-3). Die ^{13}C -

Anreicherung im Atemgas zeigt, dass eine bakterielle Umsetzung von ^{13}C -LU stattgefunden haben muss. Die $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung dieser Probandin erreichte jedoch ca. 12 h nach Aufnahme von ^{13}C -LU wieder nahezu den Ausgangswert. Offensichtlich fand nach dieser Zeit keine weitere bakterielle Umsetzung des Markers mehr statt. Möglicherweise wurde bei dieser Probandin ^{13}C -LU bzw. ^{13}C -LU oder ^{13}C -GU auch im Colon absorbiert und renal wieder ausgeschieden. Zur weiteren Aufklärung wären Analysen auf ^{13}C -LU, ^{13}C -GU und ^{13}C -Harnstoff insbesondere in späteren als 24 h nach der Markeraufnahme zu sammelnden Urinfraktionen hilfreich.

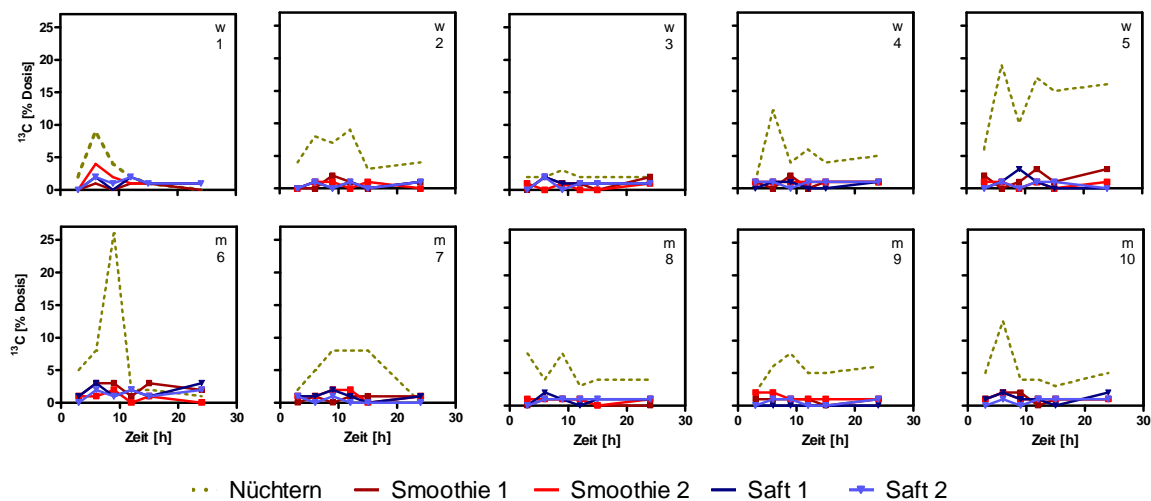


Abb. 5-3 ^{13}C -Urinzeitprofile (% Dosis) der Versuchspersonen aus Humanstudie II nach der Marker- verabreichung (500 mg ^{13}C -LU) und der Aufnahme von Smoothie (500 mg ^{13}C -LU + Smoothie 1 + Smoothie 2) bzw. Saft (500 mg ^{13}C -LU + Saft 1 + Saft 2) (m = männlich, w = weiblich)

Insgesamt lassen sich keine unterschiedlichen „langfristigen“ Wirkungen der einzelnen Testgetränke auf die renale ^{13}C -Ausscheidung erkennen. Ob die verringerten renalen ^{13}C -Ausscheidungen bei gleichzeitiger, „kurzfristiger“ Zufuhr der Testgetränke durch Inhaltsstoffe der Testgetränke wie Anthocyane, Polyphenole und Ballaststoffe oder durch veränderte orozökale Transitzeiten bewirkt wurden, ist anhand der vorliegenden Daten nicht erkennbar.

5.2.3 Renale ^{15}N -Exkretion

Die ^{15}N -Ausscheidung im Urin nach oraler Aufnahme von $^{15}\text{N}_2$ -LU sollte Informationen über Fermentationseigenschaften der intestinalen Mikrobiota unter dem Einfluss der verabreichten Testgetränke mit unterschiedlichem Anthocyan- und Ballaststoffgehalt liefern. Die N-Ausscheidung über den Urin steht in engem physiologischen Zusammenhang zum mikrobiellen N-Umsatz im Intestinaltrakt. Dies beruht darauf, dass im Darm bakteriell aus Protein und anderen N-haltigen Substraten freigesetztes NH_3 nach Absorption und Umwandlung in Harnstoff über den Urin ausgeschieden werden kann (Abb. 5-2, Abb. 2-12). Das Colon gilt als Hauptort der bakteriellen N-Umsetzungen im Intestinaltrakt. Die Menge

des im Colon gebildeten NH_3 ist abhängig von der Proteinaufnahme über die Nahrung, dem metabolischen Zustand des Wirtes und dem Energie-/Substratangebot für die intestinale Mikrobiota. Eine Akkumulation von NH_3 im Lumen des Colons kann zu lokalen Intoxikationen und anderen Schäden führen [Geboes *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 1999]. Mit oral aufgenommenem $^{15}\text{N}_2$ -LU als nicht invasivem, nur mikrobiell umsetzbarem Marker, hängt daher auch die ^{15}N -Ausscheidung im Urin mit der bakteriellen Fermentation N-haltiger Substrate im Colon zusammen [Geboes *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 1999]. Eine verminderte ^{15}N -Ausscheidung im Urin resultiert demnach aus einer verminderten Bildung von NH_3 im Colon und ist als gesundheitlich positiv für den Wirt zu bewerten [Geboes *et al.*, 2005].

In verschiedenen Studien mit dem Einsatz von $^{15}\text{N}_2$ -LU wurde gezeigt, dass eine mehrtägige oder mehrwöchige Zufuhr („langfristig“) von Pro- oder Präbiotika oder Ballaststoffen zu einer verminderten ^{15}N -Ausscheidung im Urin führt [Cloetens *et al.*, 2008; De Preter *et al.*, 2007; Wutzke *et al.*, 2010]. Dieser Effekt konnte auch bei gleichzeitiger Zufuhr („kurzfristig“), d.h. bei „aktueller“ Substratverfügbarkeit, der Pro-/Präbiotika und Ballaststoffe zusammen mit $^{15}\text{N}_2$ -LU beobachtet werden und war hier z.T. sogar stärker ausgeprägt [Cloetens *et al.*, 2008; De Preter *et al.*, 2007]. Zur Erklärung führen die Autoren an, dass den Bakterien durch das erhöhte Angebot an fermentierbaren Kohlenhydraten im Colon intestinal vorhandene N-Quellen in Form von Proteinen zum Aufbau von Zellmasse dienten und nicht bakteriell fermentiert und die N-haltigen Metabolite später im Urin ausgeschieden wurden. Demnach folgte bei verminderter bakterieller Proteinfermentation und höherem Einbau von luminalem Stickstoff und NH_3 in bakterielle Biomasse eine verminderte renale ^{15}N -Ausscheidung und damit einhergehend eine teilweise höhere ^{15}N -Ausscheidung über die Fäzes (Abb. 5-2, 2-12) [De Preter *et al.*, 2007; Geboes *et al.*, 2005]. Dieser Effekt scheint insbesondere durch das „aktuelle“ Substratangebot bei „kurzfristiger“ Zufuhr der Testsubstanzen hervorgerufen zu werden [Cloetens *et al.*, 2008; De Preter *et al.*, 2007; Geboes *et al.*, 2005].

In Humanstudie I wurde der langfristige Effekt des Smoothies, des Saftes und des Placebogetränks auf die renale ^{15}N -Ausscheidung nach Aufnahme von $^{15}\text{N}_2$ -LU untersucht. Insgesamt lag die ^{15}N -Ausscheidung an allen Messtagen in den ersten 24 h nach Aufnahme des Markers zwischen ca. 18-20 % der verabreichten ^{15}N -Dosis (Tab. 4-3) und war damit geringer als in vergleichbaren Studien mit dem Einsatz von $^{15}\text{N}_2$ -LU. In diesen wurden mittlere Basalkonzentrationen von ca. 36-45 % und nach Zufuhr unverdaulicher Kohlenhydrate von ca. 30 % der verabreichten Dosis ^{15}N innerhalb der ersten 24 h nach Verabreichung des Markers im Urin wiedergefunden [Cloetens *et al.*, 2008; De Preter *et al.*, 2004; Wutzke *et al.*, 2010]. Wie in der vorliegenden Arbeit variierte die renale ^{15}N -Ausscheidung interindividuell sowohl innerhalb wie auch zwischen diesen verschiedenen Untersuchungen stark. Übereinstimmend wurde in all diesen Untersuchungen der größte Anteil der verabreichten ^{15}N -Dosis in der 6-24 h nach der Markeraufnahme gesammelten

Urinfraktion wiedergefunden. Dabei waren die beobachteten Effekte durch Ballaststoffe in dieser Fraktion am stärksten ausgeprägt [Cloetens *et al.*, 2008; Wutzke *et al.*, 2010]. Diese und andere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die gemessene ^{15}N -Ausscheidung in der 0-6 h nach der Markeraufnahme gesammelten Urinfraktion hauptsächlich auf ^{15}N , ^{15}N -Ureiden wie $^{15}\text{N}_2$ -GU oder $^{15}\text{N}_2$ -LU beruhen, die aus enzymatischer Spaltung und Absorption im Dünndarm stammen und daher als Untersuchungsparameter für mikrobielle Fermentationseigenschaften im Colon vernachlässigt werden können [De Preter *et al.*, 2011; Wutzke *et al.*, 2010].

In Humanstudie I der vorliegenden Arbeit wurde mit ca. 14-17 % der verabreichten ^{15}N -Dosis die maximale ^{15}N -Ausscheidung der 30 Probandinnen ebenfalls in den 6-24 h gesammelten Urinfraktionen nachgewiesen; danach fiel die ^{15}N -Ausscheidung im Sammelintervall von 24-30 h mit ca. 2 % der aufgenommenen Dosis ^{15}N wieder deutlich geringer aus (Tab. 4-3). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Dauer des Sammelzeitraums für die Urinproben ausreichend war und der größte Anteil ^{15}N innerhalb von 24 Stunden ausgeschieden worden ist. Unterschiedliche Effekte der einzelnen Testgetränke mit Hinweisen auf einen Einfluss der bakteriellen Fermentation im proximalen Colon hätten daher auch in diesem Sammelintervall auftreten müssen [Cloetens *et al.*, 2008].

In verschiedenen Untersuchungen wurden mit ca. 50-60 % ein Großteil der verabreichten ^{15}N -Dosis, auch bei Untersuchungen mit Urinsammlungen von > 24 h nach Markeraufnahme, nicht im Urin wiedergefunden [Cloetens *et al.*, 2008; De Preter *et al.*, 2004; Wutzke *et al.*, 2010]. Dies lässt sich einerseits dadurch erklären, dass lumbales und bakteriell freigesetztes $^{15}\text{NH}_3$ aus $^{15}\text{N}_2$ -LU im Colon in Abhängigkeit von der Proteinzufuhr vom Wirt resorbiert und als Stickstoffquelle z.B. zur Synthese von Aminosäuren benutzt wird [Jackson *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2004]. Andererseits konnte in Studien mit quantitativer Stuhlprobensammlung gezeigt werden, dass die Zufuhr unverdaulicher Kohlenhydrate zu einer vermehrten ^{15}N -Ausscheidung über den Stuhl, vermutlich in Form von bakteriellem Protein, einhergehend mit einer verminderten renalen Ausscheidung, führen kann [De Preter *et al.*, 2007; Geboes *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 1999]. Um zu klären, wie viel ^{15}N letztendlich dem Wirt für Synthesen zur Verfügung stand und wie viel über bakterielle Biomasse und/oder als $^{15}\text{N}_2$ -LU und/oder $^{15}\text{N}_2$ -GU im Stuhl ausgeschieden wurde, hätten in der eigenen Arbeit Stuhlproben quantitativ gesammelt und auf entsprechende ^{15}N -Anreicherung untersucht werden müssen. Innerhalb des Untersuchungsrahmens und -schwerpunktes der vorliegenden Studie war dies jedoch den Versuchspersonen nicht zuzumuten und es wäre ebensowenig praktisch umsetzbar gewesen (unzureichende Lagerkapazität bei -20 °C und räumliche Gegebenheiten zur Probenverarbeitung und -aufbereitung).

Trotz großer interindividueller Unterschiede bei der renalen ^{15}N -Ausscheidung wurde von anderen Autoren bei vergleichbarem Untersuchungsansatz eine signifikant verminderte ^{15}N -

Ausscheidung im Urin nach Zufuhr von Pro- oder Präbiotika oder Ballaststoffen beobachtet [Cloetens *et al.*, 2008; De Preter *et al.*, 2007; De Preter *et al.*, 2011; Wutzke *et al.*, 2010]. Allerdings ist in diesen Studien ein kleineres und weitaus heterogeneres Probandenkollektiv als in Humanstudie I untersucht worden. So untersuchten Cloetens *et al.* (2008) in zwei Gruppen von jeweils 10 Personen sowohl männliche und weibliche Probanden. Außerdem wurde hier nur ein Basalwert für die ^{15}N -Ausscheidung in Urin und Stuhl als Vergleichswert für die Interventionseffekte bestimmt, während in Humanstudie I der vorliegenden Arbeit zu jedem Interventionsabschnitt für alle Parameter ein „eigener“ und individueller Basalwert nach den jeweiligen Washoutabschnitten bzw. vor den Interventionsabschnitten ermittelt wurde. Auch bei De Preter *et al.* (2004) und Wutzke *et al.* (2010) war das Probandenkollektiv, bestehend aus weiblichen und männlichen Personen, mit 19 bzw. 14 Probanden und einer Körpergewichtsspanne von 51-107 kg bei Wutzke *et al.* (2010) weitaus heterogener und insgesamt kleiner als in Humanstudie I. Weiterhin lag in keiner der o.g. Studien ein doppelt-verblindetes Studiendesign wie in Humanstudie I vor, was ebenfalls kritisch bzw. als Schwäche der o.g. Studien betrachtet werden könnte.

Positiv zu werten ist allerdings die quantitative Stuhlprobensammlung über 72 Stunden an den Messtagen bei Cloetens *et al.* (2008) und Wutzke *et al.* (2010), was eine Bilanzierung hinsichtlich der ^{15}N -Ausscheidung in Urin und Fäzes erlaubte. Dabei konnten Cloetens *et al.* (2008) und Wutzke *et al.* (2010) eine signifikant verminderte renale ^{15}N -Ausscheidung nach Zufuhr von resistenter Stärke bzw. Präbiotika feststellen. Gleichzeitig konnten tendenziell höhere ^{15}N -Werte im Stuhl beobachtet werden, allerdings ohne statistische Signifikanz.

In einer weiteren Placebo-kontrollierten Studie mit Crossover-Design konnten De Preter *et al.* (2007) bei 20 Versuchspersonen, männlich und weiblich, nach kurzfristiger bzw. bei gleichzeitiger Zufuhr von Inulin und $^{15}\text{N}_2$ -LU eine verminderte ^{15}N -Ausscheidung im Urin und gleichzeitig höhere ^{15}N -Ausscheidung im Stuhl gegenüber den basalen ^{15}N -Ausscheidungswerten messen. Positiv ist auch hier die Bestimmung von ^{15}N in Stuhlproben zu bewerten, wodurch weitere Informationen bezüglich der intestinalen Metabolisierung von $^{15}\text{N}_2$ -LU gewonnen werden können. Allerdings sollte kritisch gesehen werden, dass in allen o.g. Studien kein doppelt-verblindetes, sondern entweder ein einfach-verblindetes oder „open-labelled“ bzw. „offenes“ Studiendesign gewählt wurde. Weiterhin bestanden beim Großteil der Untersuchungen keine einheitlichen Ernährungsvorschriften während der Washout- und Interventionsabschnitte für die Versuchspersonen; es sollte die „übliche“ Ernährung beibehalten und auf fermentierte Milchprodukte, „große“ Mengen Ballaststoffe, Pro- und Präbiotika verzichtet werden [Cloetens *et al.*, 2008; De Preter *et al.*, 2004; De Preter *et al.*, 2007]. Demgegenüber ist die sehr „standardisierte“ Ernährung der Versuchspersonen aus Humanstudie I über den gesamten Studienzeitraum, mit Ausnahme

der „0-Phasen“, dahingehend positiv zu bewerten, dass möglichst ausschließlich die Effekte der Anthocyane und Ballaststoffe aus den jeweiligen Testgetränken auf die renale ^{15}N -Ausscheidung und die übrigen Parameter beobachtet werden konnten (A-2). Da sich in Humanstudie I keine Änderung der mittleren renalen ^{15}N -Ausscheidung feststellen ließ, ist anzunehmen, dass die bakteriellen Umsetzungen im Colon durch die langfristige Zufuhr von im Smoothie und Saft enthaltenen Anthocyanen und Ballaststoffen nicht nachweisbar beeinflusst worden sind.

In Humanstudie II schien die renale ^{15}N -Ausscheidung zwischen den Versuchspersonen im Zustand „nüchtern“ in den einzelnen Fraktionen stärker zu variieren als bei gleichzeitiger Zufuhr der Testgetränke. Während die renale ^{13}C -Ausscheidung bei allen Versuchspersonen dabei vermindert war, lag zwar die mittlere renale ^{15}N -Ausscheidung ebenfalls etwas niedriger, verminderte ^{15}N -Ausscheidungen traten jedoch nur bei fünf Versuchspersonen (2, 4, 5, 6, 7) auf (Abb. 4-23, Tab. 4-12). Die mittlere renale ^{15}N -Ausscheidung erreichte in den ersten 24 h im Zustand „nüchtern“ etwa 30 % der verabreichten Dosis. Dieser Wert wurde allerdings durch die sehr hohe ^{15}N -Ausscheidung von 93 % der Probandin 5 maßgeblich beeinflusst. Auch andere Autoren fanden mit dem mittleren Ausscheidungsniveau der Humanstudie II vergleichbare Werte [Wutzke *et al.*, 2010] (Tab. 4-12). Im Fall der Probandin 5 wären differenzierte Analysen auf $^{15}\text{N}_2$ -GU, $^{15}\text{N}_2$ -LU und ^{15}N -Harnstoff hilfreich, um aufzuklären, inwieweit $^{15}\text{N}_2$ -LU überhaupt bakteriell umgesetzt oder ungespalten bzw. nur teilweise gespalten absorbiert und im Urin wieder ausgeschieden worden ist.

Bei Betrachtung der renalen ^{15}N -Ausscheidung der übrigen Versuchspersonen ist kein eindeutiger Effekt des Smoothies und Saftes erkennbar. Bei Probandin 1 der Humanstudie II war die renale ^{15}N -Ausscheidung durch die Zufuhr der Testgetränke tendenziell leicht erhöht, während die Versuchspersonen 3, 9 und 10 keine wesentlichen Änderungen aufwiesen (Abb. 4-23). Dies deutet daraufhin, dass auch die kurzfristige Zufuhr des Smoothies und Saftes die bakterielle Fermentation im Colon nicht wesentlich beeinflusst hat. Offensichtlich reichte das mit Smoothie und Saft vermehrte Wirkstoff- bzw. Substratangebot nicht aus, um die Fermentation im Colon so zu beeinflussen, dass die ^{15}N -Ausscheidung im Urin wie in Untersuchungen anderer Autoren vermindert wurde [Cloetens *et al.*, 2008; De Preter *et al.*, 2007; Wutzke *et al.*, 2010]. Die bereits diskutierten Wirkungen auf die $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung und die renale ^{13}C -Ausscheidung sprechen im Sinne anderer Beobachtungen eher dafür, dass durch die Testgetränke die intestinale Motilität und der orozökale Transit von ^{13}C -LU verändert bzw. beschleunigt worden ist [Geboes *et al.*, 2005; Priebe *et al.*, 2004].

Zur besseren Lesbarkeit und Vergleichbarkeit mit den ^{13}C -Urinzeitprofilen (Abb. 5-3) sind in Abbildung 5-4 nur die ^{15}N -Urinzeitprofile der 10 Probandinnen im Zustand „nüchtern“ aus Humanstudie II dargestellt. Beim Vergleich der Abbildungen 5-3 und 5-4 fällt auf, dass sich die ^{13}C - und ^{15}N -Urinzeitprofile der einzelnen Versuchspersonen „nüchtern“ stark ähnelten.

Dies lässt sich besonders gut bei den Versuchspersonen 1, 5, 6, 7, 8, 9 und 10 erkennen. Hier traten jeweils nahezu gleiche maximale Ausscheidungszeitpunkte von ^{13}C und ^{15}N im Urin auf (Abb. 5-3, Abb. 5-4).

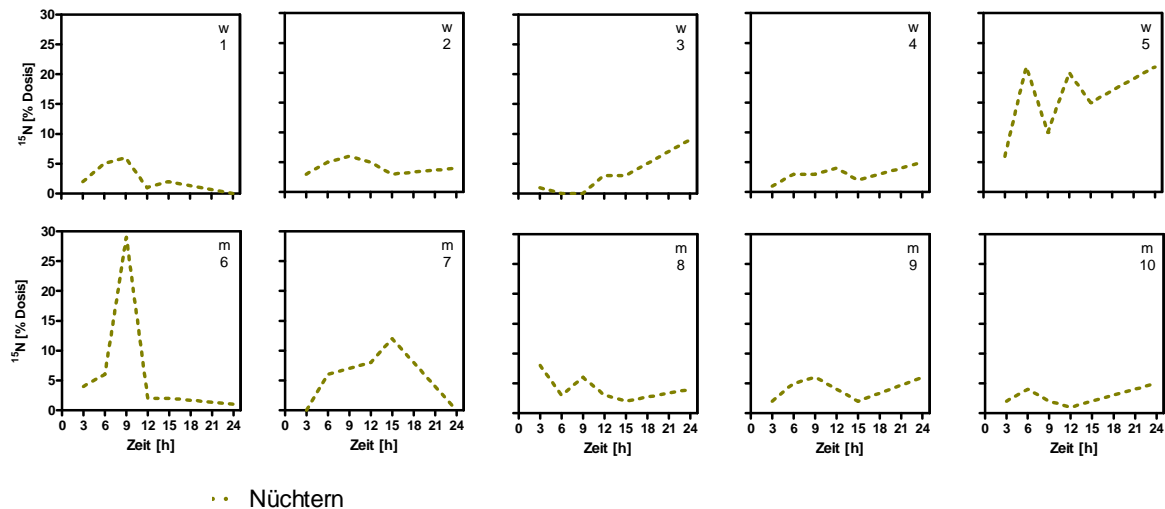


Abb. 5-4 ^{15}N -Urinzeitprofile (% Dosis) der Versuchspersonen aus Humanstudie II nach der Marker- verabreichung (75 mg $^{15}\text{N}_2\text{-LU}$) „nüchtern“ (m = männlich, w = weiblich)

In diesen Fällen unterlagen die beiden Marker ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2\text{-LU}$ - wie in der Literatur beschrieben [De Preter *et al.*, 2011; Wutzke *et al.*, 2010] - vermutlich einer ähnlichen intestinalen Metabolisierung, die damit bei den einzelnen Versuchspersonen auch jeweils zu ähnlichen renalen ^{13}C - und ^{15}N -Ausscheidungen in ungespaltener oder teilgespaltener Form führte.

Allerdings könnten unter Berücksichtigung der Tatsache, dass oral verabreichtes ^{13}C in Form von ^{13}C -LU größtenteils nach intestinaler Metabolisierung als $^{13}\text{CO}_2$ über den Atem ausgeschieden wird, auch unterschiedliche ^{13}C - und ^{15}N -Urinzeitprofile auftreten [Jackson *et al.*, 1999]. Solche Unterschiede lassen sich für zwei Versuchspersonen aus Humanstudie II bei Zufuhr der Testgetränke darstellen (Abb. 5-5). Hier könnten unter der Voraussetzung einer durch die Zufuhr der Testgetränke verkürzten oroökalen Transitzeit und damit verkürzten Verweildauer im Dünndarm größere Anteile von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2\text{-LU}$ in das Colon gelangt und dort bakteriell umgesetzt worden sein.

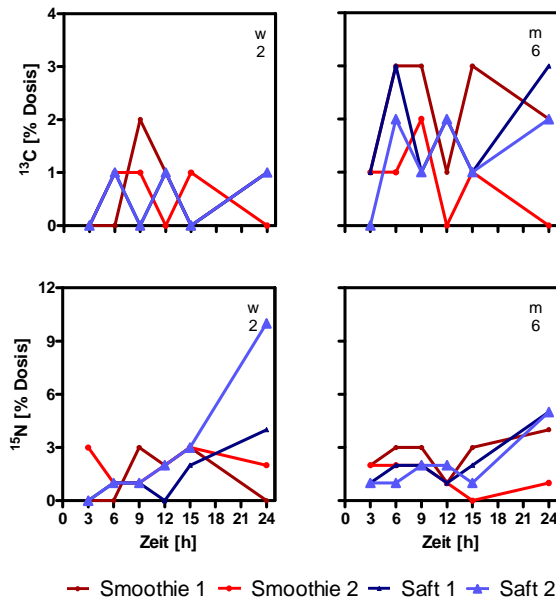


Abb. 5-5 ^{13}C - und ^{15}N -Ausscheidungsprofile im Urin (% Dosis) von 2 Versuchspersonen (2, 6) aus Humanstudie II nach der Markerverabreichung und der Aufnahme von Smoothie (500 mg ^{13}C -LU + 75 mg $^{15}\text{N}_2$ -LU + Smoothie 1 + Smoothie 2) bzw. Saft (500 mg ^{13}C -LU 75 mg + $^{15}\text{N}_2$ -LU + Saft 1 + Saft 2) (m = männlich, w = weiblich)

Wie Abbildung 5-5 zeigt, variierten die in den einzelnen Urinfraktionen gemessenen Dosisanteile jedoch sehr stark und lassen keine eindeutigen Richtungen für unterschiedliche bakterielle Umsetzungen der beiden Marker erkennen. Differenzierte Analysen der renalen ^{13}C - und ^{15}N -Ausscheidungsprodukte könnten möglicherweise Ansatzpunkte zur Erklärung der stark variierenden Dosisanteile in den Urinfraktionen dieser Versuchspersonen liefern.

Im Zustand „nüchtern“ wurden in Humanstudie II im Mittel zwischen ca. 30-35 % der verabreichten ^{13}C - und ^{15}N -Dosis innerhalb von 24 h nach Markeraufnahme im Urin ausgeschieden. Dabei lag die ^{13}C -Ausscheidung besonders bis zu 6 h nach der Markeraufnahme tendenziell etwas höher als die ^{15}N -Ausscheidung (Tab. 4-11, 4-12). Durch die Aufnahme der Testgetränke wurden dagegen in den von 0-6 und 6-24 h gesammelten Urinfraktionen größere ^{15}N - als ^{13}C -Anteile ausgeschieden (Tab. 4-11, 4-12). Dies deutet - ähnlich wie in Untersuchungen von Wutzke *et al.* (1997) - auf eine vermehrte bakterielle Umsetzung von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU bei Zufuhr der Testgetränke hin. Demnach würde ein größerer Anteil des ^{13}C - und ^{15}N -Isotops in Form von $^{13}\text{CO}_2$ über den Atem bzw. ^{15}N im Stuhl ausgeschieden werden.

Insgesamt lassen die Ergebnisse der Humanstudie II erkennen, dass die „kurzfristige“ Zufuhr des Smoothies und Saftes die intestinale Metabolisierung von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU beeinflusst hat.

Es ist jedoch davon auszugehen, dass die beiden Marker ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU bakteriell nicht vollständig umgesetzt worden sind. De Preter *et al.* (2011) berichten über relativ konstante

$^{15}\text{N}_2$ -GU-Ausscheidungen, die durch eine Intervention mit Lactulose bei 13 Versuchspersonen auch nach Korrektur um die $^{15}\text{N}_2$ -GU-Ausscheidung nicht beeinflusst wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse und unter Berücksichtigung des hohen Zeit- und Arbeitsaufwandes zur Bestimmung von $^{15}\text{N}_2$ -GU im Urin erscheint zur Untersuchung der Wirkung von Nahrungsinhaltsstoffen auf den intestinalen bakteriellen N-Stoffwechsel, welches auch Ziel der vorliegenden Arbeit war, zunächst die Analyse der ^{15}N -Anreicherung im Urin sinnvoll und ausreichend. Differenziertere Analysen von ^{13}C - und ^{15}N -Ausscheidungsprodukten im Urin würden zur weiteren Aufklärung des Metabolismus der markierten Ureide beitragen. Für Humanstudie II bleibt zunächst festzuhalten, dass die „kurzfristige“ Zufuhr des Smoothies und Saftes die intestinale Metabolisierung von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU beeinflusst hat.

5.3 Renale p-Kresol-Exkretion

P-Kresol entsteht bei der Fermentation von Tyrosin durch Darmbakterien im Colon, wird nach Absorption im Urin ausgeschieden und kann als Marker zur Beurteilung der Proteinfermentation im Colon dienen [De Loor, 2005; Hamer *et al.*, 2011; Meyer, Hostetter, 2012]. Die renale p-Kresol-Ausscheidung wird maßgeblich durch die Ernährung beeinflusst und korreliert positiv mit der Proteinzufuhr. Demnach kann die p-Kresol-Ausscheidung im Urin großen interindividuellen Schwankungen unterliegen, wobei in der Literatur Werte von ca. 20-100 mg pro 24 h-Urin zu finden sind [Patel *et al.*, 2012; Vanholder *et al.*, 2011]. Eine verminderte, renale p-Kresol-Ausscheidung spiegelt dabei eine verminderte proteolytische Fermentationsaktivität intestinaler Bakterien wider. In verschiedenen Studien wurde die renale p-Kresol-Ausscheidung zusammen mit der renalen ^{15}N -Ausscheidung nach Aufnahme von $^{15}\text{N}_2$ -LU gemessen, um die Wirkung von Pro- und Präbiotika auf bakterielle Fermentationseigenschaften im Colon zu untersuchen. Die bei mehrwöchiger Zufuhr von Prä- und Probiotika beobachtete verminderte p-Kresol-Ausscheidung im Urin wurde auf eine höhere Verfügbarkeit und Fermentation unverdaulicher Kohlenhydrate und verringerte proteolytische Umsetzungen intestinaler Bakterien im Colon zurückgeführt [De Preter *et al.*, 2007; De Preter *et al.*, 2008; Geypens *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 2012].

In Humanstudie I lag die mittlere renale p-Kresol-Ausscheidung der 30 Probandinnen in den ersten 24 h nach Sammelbeginn bei starker interindividueller Variation an allen 6 Messtagen zwischen ca. 22-30 mg (Tab. 4-4). Dabei waren auch relativ große intraindividuelle Schwankungen an den Messtagen zu beobachten (Tab. 4-4, Anhang Tab. A-5, Tab. A-6). Vergleichbare Werte bei ebenfalls großen interindividuellen Unterschieden wurden in o.g. Studien gefunden [De Preter *et al.*, 2007; De Preter *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2012].

Interessanterweise wurde bei De Preter *et al.* (2008) beobachtet, dass die Wirkung von Präbiotika auf mikrobielle Parameter, wie die renale p-Kresol- und ^{15}N -Ausscheidung nach

oralen Aufnahme von $^{15}\text{N}_2$ -LU, von den ursprünglichen Bedingungen im Colon abhängig ist. Demnach war bei den Versuchspersonen, die relativ hohe basale Ausscheidungswerte von p-Kresol und ^{15}N aufwiesen, die Wirkung der Präbiotikazufuhr durch ein starkes Absinken der renalen p-Kresol- und ^{15}N -Ausscheidung gekennzeichnet und damit besonders deutlich ausgeprägt. Solche Effekte konnten in der vorliegenden Arbeit nach Zufuhr der Testgetränke nicht beobachtet werden. Allerdings ist in diesem Zusammenhang das randomisierte Crossover-Studiendesign sowie die vor jedem Interventionsabschnitt bestimmten Basalwerte als Stärke der Humanstudie I im Vergleich zu den Untersuchungen von De Preter *et al.* (2004, 2007, 2008), Cloetens *et al.* (2008) und Wutzke *et al.* (2010) zu sehen. Damit konnte sichergestellt werden, dass jede Versuchsperson Proben zur Ermittlung für ihre eigenen, individuellen Kontroll- bzw. Basalwerte der untersuchten Parameter vor jedem Interventionsabschnitt lieferte.

Auffallend gering erscheint die p-Kresol-Ausscheidung der Probandin, die keine $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas aufwies (Tab. A-5, Tab. A-6, Probandin 28). Die Werte dieser Probandin variierten an den 6 Messtagen in den von 6-24 h nach der Markeraufnahme gesammelten Urinfraktionen zwischen 0,73-6 mg p-Kresol und lagen damit deutlich unter den mittleren Ausscheidungen der 30 Probandinnen (Tab. 4-4, Tab. A6). In Verbindung mit der fehlenden $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung lässt sich daher auf eine geringe bakterielle Fermentationsaktivität im Colon dieser Probandin schließen.

Die renale Exkretion von p-Kresol ist bei gesunden Personen hauptsächlich abhängig von der mit der Nahrung aufgenommenen Menge an Protein [Geypens *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 2012]. Aufgrund der standardisierten Ernährungsvorschriften der 30 Probandinnen und damit sehr ähnlichen Proteinaufnahmen in den Washout- und Interventionsabschnitten und Messtagen können derartige Einflüsse auf die p-Kresol-Ausscheidung weitgehend ausgeschlossen werden. Demnach hat die 14-tägige Zufuhr der Testgetränke bei großen interindividuellen Unterschieden zu keiner Änderung der renalen p-Kresol-Ausscheidung geführt. Weder die renalen p-Kresol- und ^{15}N -Ausscheidungen noch die $^{13}\text{CO}_2$ -Abgaben über den Atem lassen einen „langfristigen“ Einfluss von mit den Testgetränken zugeführten Anthocyanen, Polyphenolen und Ballaststoffen auf die proteolytische Fermentationsaktivität der Mikrobiota erkennen.

Auch bei „kurzfristiger“ Zufuhr von Pro- und Präbiotika beobachteten De Preter *et al.* (2007) eine verminderte p-Kresol-Ausscheidung im Urin. Ob diesbezüglich „kurzfristige“ Effekte durch die in vorliegender Untersuchung eingesetzten Testgetränke vorlagen, lässt sich nicht beantworten, weil die p-Kresol-Ausscheidungen in Humanstudie II nicht gemessen wurden (siehe Abschnitt 4.2).

5.4 Kurzkettige Fettsäuren und pH-Wert in Stuhlproben

Die wichtigsten bakteriellen Fermentationsprodukte im Colon stellen die kurzkettigen Fettsäuren, hauptsächlich Acetat, Propionat und Butyrat dar. Bei hohem Substratangebot in Form von Kohlenhydraten werden sie im proximalen Colon in besonders großen Mengen gebildet (Abb. 2-9). Acetat, Propionat und Butyrat tragen u.a. als Energielieferant für Epithelzellen und durch Senkung des luminalen pH-Wertes zur Darmgesundheit bei [Hamer *et al.*, 2011; Vipperla, O'Keefe, 2012]. Dagegen entstehen bei der Fermentation von Proteinen im Colon neben Isobutytrat, Isovalerat und Valerat auch potentiell toxische Metabolite wie phenolische und schwefelhaltige Verbindungen sowie Ammoniak. In Stuhlproben nachweisbares Isobutytrat, Isovalerat und Valerat kann als Marker für das Maß proteolytischer Fermentation im Colon dienen. In unterschiedlichen Abschnitten des Colons überwiegen in Abhängigkeit vom Substratangebot saccharolytische- oder proteolytische Fermentationsaktivitäten. Da vorzugsweise unverdauliche Kohlenhydrate durch die intestinale Mikrobiota fermentiert werden, herrscht im proximalen Colon eine hohe saccharolytische Fermentation unter Bildung von Acetat, Propionat und Butyrat und damit einhergehendem niedrigerem pH-Wert vor. Mit sinkendem Angebot an Kohlenhydraten nimmt die Kohlenhydratfermentation entlang des Colons ab, während vermehrt Proteine umgesetzt werden und der pH-Wert ansteigt [Hamer *et al.*, 2011; Nyangale *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2013; Topping, Clifton 2001].

Die Bestimmung kurzkettiger Fettsäuren und des pH-Wertes in Stuhlproben kann Hinweise auf Fermentationseigenschaften im Colon geben. Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass einerseits nur ca. 5 % der im Colon gebildeten Fettsäuren über den Stuhl ausgeschieden werden und andererseits die Konzentration der Fettsäuren und der pH-Wert im Stuhl weitestgehend dem Zustand im distalen Colon entspricht, sich aber deutlich von der in anderen Abschnitten des Colons unterscheiden kann [Eckburg *et al.*, 2005; Hamer *et al.*, 2011; Puertollano *et al.*, 2014; Topping, Clifton 2001]. In Humanstudie I der vorliegenden Arbeit wurden mittlere Konzentrationen von ca. 73-97 $\mu\text{mol/g}$ TM für Acetat, ca. 30-40 $\mu\text{mol/g}$ TM für Propionat und ca. 22-28 $\mu\text{mol/g}$ TM für Butyrat in Stuhlproben der 30 Probandinnen gemessen (Tab. 4-6). Diese Werte liegen höher als in Stuhlproben anderer Humanstudien, die für Acetat bei ca. 45-50, für Propionat bei ca. 13-17 und für Butyrat ca. 11-14 $\mu\text{mol/g}$ TM ausweisen [Schwartz *et al.*, 2010; Walton *et al.*, 2012]. Zwar war in der eigenen Untersuchung Acetat in den größten Mengen vor Propionat und Butyrat nachzuweisen, doch auch das Verhältnis der drei Fettsäuren zueinander wich von Daten aus der Literatur ab. Während in der Literatur das Verhältnis von Acetat : Propionat : Butyrat mit etwa 60 : 25 : 15 angegeben und beschrieben wird, betrug das Verhältnis in der vorliegenden Arbeit etwa 45-50 : 30 : 20 (Abb. 4-8) [Schwartz *et al.*, 2010; Vipperla, Keefe

2012; Walton *et al.*, 2012]. Zhao *et al.* (2006) konnten in Stuhlproben eines Probanden Konzentrationen (in $\mu\text{mol/g}$) von nur ca. 24 Acetat, 6 Propionat und ca. 5 Butyrat nachweisen. Für diese Unterschiede kommen mehrere Einflussfaktoren in Betracht. Dazu zählen neben physiologischen Vorgängen im Stoffwechsel der untersuchten Personen insbesondere auch die Verfahren der Stuhlprobensammlung, der Probenlagerung, des Proben transports und der Analytik. Es sollte auch berücksichtigt werden, dass das Substratangebot für die Mikrobiota im Darm und im Stuhl, deren Fermentationsaktivitäten und die daraus resultierenden Metabolite durch körperliche Aktivität, Hormone, Digesta-Transitzeit und Zeitpunkt der Stuhlprobennahme beeinflusst werden und zu starken inter- und intraindividuellen Variationen beitragen können [Eckburg *et al.*, 2005; Flint, 2012; Mai *et al.*, 2010].

Sowohl bei Walton *et al.* (2012) wie auch in der vorliegenden Arbeit ergaben sich sehr hohe Standardabweichungen, während diese bei Schwartz *et al.* (2010) geringer ausfielen. Möglicherweise sind die unterschiedlichen Probenaufbereitungsverfahren zur Analyse der Fettsäuren in den o.g. Studien mit Derivatisierung bei Walton *et al.* (2012), Gefriertrocknung bei Schwartz *et al.* (2010) und die wesentlich höhere Versuchspersonenanzahl von knapp 100 bei Schwartz *et al.* (2010) gegenüber 20 bei Walton *et al.* (2012) und 30 in der vorliegenden Arbeit eine Ursache für die Unterschiede in der Höhe der Standardabweichungen.

In Humanstudie I variierte die Acetatkonzentration an den 6 Messtagen interindividuell zwischen ca. 3-765 $\mu\text{mol/g}$ TM, die Propionatkonzentration zwischen ca. 4-314 $\mu\text{mol/g}$ TM und die Butyratkonzentration zwischen ca. 7-164 $\mu\text{mol/g}$ TM (Tab. A-7, Tab. A-8, Tab. A-9). Da ein Schwerpunkt der Humanstudie I darin lag, den Einfluss von Anthocyanen *in vivo* auf die Mikrobiota zu untersuchen, sollen die Unterschiede zu den zitierten Ergebnissen anderer Studien bezüglich des Konzentrationsniveaus außer Betracht bleiben. Wichtiger erscheint hier der Vergleich zwischen den Ergebnissen für die einzelnen Versuchsabschnitte. Jedoch ergaben sich unabhängig von Letzteren an allen Messtagen ähnliche Größenordnungen für die Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren im Stuhl. Aufgrund der hier ebenso großen inter- wie auch intraindividuellen Unterschiede ließen sich über die Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat im Stuhl keine Einflüsse von mit den Testgetränken zugeführten Anthocyanen und Ballaststoffen nachweisen. Die in Stuhlproben der 30 Probandinnen (Humanstudie I) bestimmten mittleren Konzentrationen von Isobutyrat, Isovalerat und Valerat lagen mit bis zu ca. 30 $\mu\text{mol/g}$ TM Stuhl sehr hoch (Tab. 4-7), wobei auch hier sehr große intra- und interindividuelle Schwankungen auftraten (Tab. A-10, Tab. A-11, Tab. A-12). Demgegenüber sind in der Literatur für diese Fettsäuren nur Werte im einstelligen Bereich zu finden [Schwartz *et al.*, 2010; Walton *et al.*, 2012]. Die für derartige Unterschiede in Betracht kommenden Einflussfaktoren wurden bereits im Zusammenhang

mit den Ergebnissen zu den Hauptfettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat angesprochen. Desweiteren können aufgrund der unterschiedlichen Analysenmethoden in der vorliegenden Arbeit die Verhältnisse von Acetat, Propionat und Butyrat zu Isobutyrat, Isovalerat und Valerat nicht näher betrachtet werden. Wichtiger für das Untersuchungsziel scheint allerdings auch hier der Vergleich zwischen den Versuchsabschnitten. Die hohen Standardabweichungen spiegeln auch bei den Konzentrationen von Isobutyrat, Isovalerat und Valerat in den Stuhlproben der 30 Probandinnen die großen interindividuellen Unterschiede wider. Es bleibt festzustellen, dass anhand der bestimmten Iso-Fettsäuren im Stuhl die 14-tägige Zufuhr der Testgetränke keine Einflüsse auf proteolytische Fermentationsaktivitäten erkennen lässt.

Im Einklang mit den Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren konnten anhand der pH-Werte im Stuhl der 30 Probandinnen, die durch die Fettsäuren maßgeblich mitbestimmt werden, keine weiteren Informationen bezüglich eines Einflusses der Testgetränke geliefert werden (Tab. 4-5).

Es gibt in der Literatur nur wenige Ergebnisse zu Wechselwirkungen von Polyphenolen/Anthocyanen und der intestinalen Mikrobiota, insbesondere kaum mit der eigenen Arbeit vergleichbare Studien, in denen der Einfluss von Anthocyanen und/oder Polyphenolen auf die bakterielle Bildung kurzkettiger Fettsäuren im Colon untersucht wurde. Aura *et al.* (2005) untersuchten *in vitro* Wirkungen von Polyphenolen und Anthocyanen auf die Zusammensetzung der Mikrobiota und auf die mikrobielle Umsetzung dieser Substanzen im Stuhl. Verschiedene Studien deuten auf einen präbiotischen Effekt von Anthocyanen und Polyphenolen durch Wachstumsförderung kommensaler und/oder Hemmung des Wachstums potentiell pathogener Bakterien/-gruppen hin [Jiménez-Girón *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2006; Ortuno *et al.*, 2012; Tzounis *et al.*, 2011; Vendrame *et al.*, 2011]. Das Verhältnis der dominanten Bakterienstämme *Bacteroidetes*/*Firmicutes* kann sich unter dem Einfluss dieser Substanzen ändern. Da *Bacteroidetes* mit einer höheren Zahl an glykosidisch-spaltenden Enzymen ausgestattet sind, die bei der Umsetzung von Polyphenolen stark involviert sind, können diese durch Polyphenole vermutlich im Wachstum stärker gefördert werden [Rastmanesh, 2011]. Parkar *et al.* (2013) beobachteten in einer *in vitro*-Studie mit menschlichen Stuhlproben einen Anstieg von Bifidobakterien nach Fermentation einzelner Polyphenole. Gleichzeitig stellten sie eine gesteigerte Produktion der kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat fest. Eine ähnliche Beobachtung machten Gross *et al.* (2010), die in einer *in vitro*-Studie mit menschlichen Stuhlproben nach Inkubation mit Polyphenolen aus schwarzem Tee, ansteigende Konzentrationen von Acetat und Butyrat und gleichzeitig tendenziell sinkende Konzentrationen an Isobutyrat und Isovalerat feststellten. In der vorliegenden Arbeit lässt sich von vornherein allein auf Basis der Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren in den Stuhlproben keine Aussage über vielleicht mögliche

präbiotische Effekte der anthocyanreichen Testgetränke treffen, die zu veränderten Fettsäure-Produktionsraten geführt haben könnten. Gross *et al.* (2010) beschrieben große interindividuelle Variationen bei der bakteriellen Umsetzung von Polyphenolen und der Bildung bakterieller Metabolite im Stuhl. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden große inter- und intraindividuelle Streuungen einschließlich der kurzkettigen Fettsäuren im Stuhl beobachtet (Abb. 4-15, Abb. 4-16, Abb. 4-17, Tab. 4-6). In einer weiteren Studie mit Ratten [Jakobsdottir *et al.*, 2013] wurden die höchsten Konzentrationen kurzkettiger Fettsäuren im Stuhl und Darminhalt nach Fütterung mit schwarzer Johannisbeere im Vergleich zur Fütterung mit Brombeere und Himbeere gefunden. Die höchste mikrobielle Diversität ergab sich im Colon der Ratten nach Fütterung mit Himbeeren. Die Autoren sehen diese Effekte weniger in der Zufuhr der Anthocyane und Polyphenolen als vielmehr im unterschiedlichen Gehalt an löslichen Ballaststoffen begründet. Diese und andere Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Einfluss auf bakterielles Wachstum und Metabolismus im Colon von der Struktur, der Quelle und der verabreichten Dosis der Polyphenole und Anthocyane sowie von dem bakteriellen Stamm abhängt [Cardona *et al.*, 2013].

Aufgrund der großen interindividuellen Unterschiede und individuellen Einflussgrößen auf die intestinale Mikrobiota erscheint es sinnvoll, die Wirkung von Nahrungsinterventionen individuell in Abhängigkeit vom mikrobiologischen und/oder metabolischen Profil, d.h. der individuellen Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota einzelner Versuchspersonen zu untersuchen [Cardona *et al.*, 2013; Flint, 2012; Gross *et al.*, 2012; Walker *et al.*, 2011]. So unterliegt die intestinale Mikrobiota in Abhängigkeit von zugeführten Nährstoffen ständigen Veränderungen in der Zusammensetzung und variiert interindividuell sehr stark [David *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2011]. Gleichzeitig werden mit der Nahrung zugeführte Substrate in Abhängigkeit von der individuellen Mikrobiota im Colon unterschiedlich bakteriell fermentiert, sodass physiologische Wirkungen von Nahrungsinhaltsstoffen wie auch Anthocyanen individuell betrachtet werden sollten [Bolca *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2011]. Demnach können die Testgetränke auch durch unterschiedliche Zusammensetzungen der intestinalen Mikrobiota der 30 Probandinnen der Humanstudie I jeweils unterschiedlich bakteriell umgesetzt worden sein und unterschiedlich stark ausgeprägte Effekte auf die Bildung der kurzkettigen Fettsäuren ausgelöst haben [Cardona *et al.*, 2013; Flint, 2012]. Ein Beleg für eine solche Annahme findet sich möglicherweise in den Ausreißern und hohen Standardabweichungen bei den Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren im Stuhl (Abb. 4-15, Abb. 4-16, Abb. 4-17, Tab. 4-6). Insgesamt lassen die gemessenen Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren im Stuhl im Einklang mit den Ergebnissen der renalen Parameter keine Aussage über eindeutige Wirkungen der Testgetränke auf die intestinale Mikrobiota zu.

5.5 Gesamtkeimzahl in Stuhlproben

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahlen in Stuhlproben der Versuchspersonen sollte Hinweise zu Einflüssen der Testgetränke auf die bakterielle Besiedlungsdichte im Colon liefern. Außerdem war zu prüfen, ob die Gesamtkeimzahlen in den Stuhlproben in Verbindung mit den übrigen, in Atemgas-, Urin- und Stuhlproben gemessenen bakteriellen Metaboliten stehen.

Zunächst sind die an allen Messtagen gegenüber Werten aus der Literatur um etwa 3 Zehnerpotenzen niedrigeren Keimzahlen auffällig [Mai *et al.*, 2004; Vaahtovuori *et al.*, 2005; Zoetendahl *et al.*, 2002]. Hierfür kommen mehrere Ursachen in Betracht. Vaahtovuori *et al.* (2005) berichten, dass die Sonde EUB 338 nicht an alle Bakterien bindet, sodass möglicherweise in der vorliegenden Arbeit nicht alle Einzelbakterien in Stuhlproben der 30 Probandinnen bei der Durchflussszytometrie registriert wurden. Eine weitere Fehlerquelle könnte die Probenaufbereitung zur Analyse am Durchflussszytometer sein, die die vorliegenden Ergebnisse möglicherweise beeinflusst hat, da hier ebenfalls Verluste von bis zu 60 % möglich zu sein scheinen [Grzonka, 2008]. Zu hohen Verlusten kann es durch die angewendeten Wasch- und Zentrifugationsschritte kommen. Weiterhin kann „Klumpenbildung“ bzw. fehlende Vereinzelung von Bakterien in Suspension, die keine differenzierte Einzelkeimerfassung im Durchflussszytometer erlaubte, zu den niedrigen Gesamtkeimzahlen beigetragen haben [Grzonka 2008, Wallner *et al.*, 1995]. Auch die Dauer der Lagerung scheint von Einfluss auf die am Durchflussszytometer zu messende Bakterienanzahl zu sein. Während in 4 % Paraformaldehyd bei -70 °C gelagerte Stuhlproben nach mehreren Monaten kaum Veränderungen aufwiesen, wurden in unbehandelt eingefrorenen Stuhlproben bereits nach zwei Monaten Lagerung geringere Keimzahlen für *C. coccoides*-*E. rectale* und *Bifidobacterium* gefunden. Im Gegensatz dazu blieben *Bacteroides* und *F. prausnitzii* in unbehandelten Proben auch bei mehr als 12-monatiger Lagerung bei -70 °C stabil [Rochet *et al.*, 2004]. Demnach sind einzelne Bakteriengruppen in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen für Stuhlproben unterschiedlich stabil. Da die Stuhlproben der Humanstudie I der vorliegenden Arbeit direkt nach Probennahme zunächst im Kühlschrank und anschließend bis zur Analyse unbehandelt bei -70 °C über mehrere Monate gelagert wurden, lassen sich Lagerungsverluste nicht ausschließen. Insgesamt können alle vorgenannten Faktoren zu den in Stuhlproben der Humanstudie I gemessenen geringen Keimzahlen beigetragen haben.

Zwischen den Keimzahlen an den 6 Messtagen der Versuchsabschnitte konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Damit liefert dieser Parameter keine Hinweise auf Einflüsse der Testgetränke (Tab. 4-8). Auffällig ist jedoch, dass bei Darstellung der Ergebnisse im zeitlichen Verlauf - unabhängig von der Testgetränkezufuhr - am 5. und 6.

Messtag ohne Unterschied zwischen diesen beiden Tagen im Mittel höhere Gesamtkeimzahlen in den Stuhlproben der 30 Probandinnen bestimmt wurden (Abb. 5-6). Möglicherweise ist dieses Ergebnis auf eine kürzere Lagerungsdauer der Stuhlproben und dadurch verminderte Verluste für Bakterien in den Stuhlproben zurückzuführen.

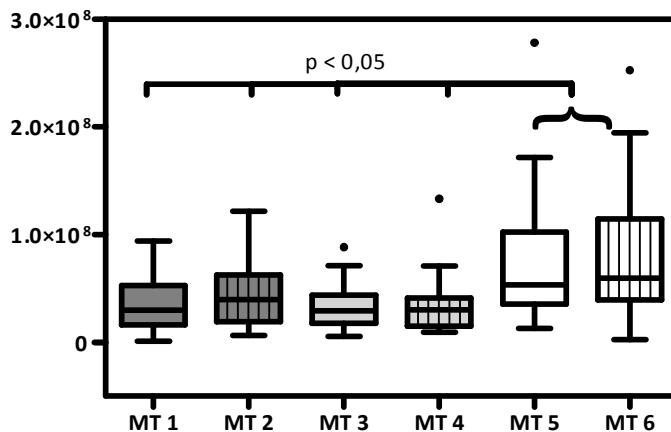


Abb. 5-6 Gesamtkeimzahl in Stuhlproben (KbE/g TM) der Probandinnen aus Humanstudie I an den 6 Messtagen in chronologischer Reihenfolge und unabhängig der Testgetränkezufuhr (KbE = Koloniebildende Einheiten, TM = Trockenmasse, MT = Messtag, n = 30)

Andererseits könnte sich - wie bei Mai *et al.* (2004) - auch die Zahl an Bakterien, die mit EUB 338 binden und detektierbar sind, über den gesamten Studienzeitraum verändert haben. Diese Autoren beobachteten nach Zufuhr von schwarzem Tee eine Abnahme der Bakterien, die mit EUB 338 binden. Wenn analog, jedoch umgekehrt hierzu in der vorliegenden Arbeit mit EUB 338 bindende Bakterien zugenommen haben sollten, wäre allerdings ein über den gesamten Studienzeitraum kontinuierliches und nicht nur an zwei Messtagen abrupt erhöhtes Ansteigen der Gesamtkeimzahlen zu erwarten. Näheren Aufschluss könnten Analysen der mikrobiologischen Zusammensetzung der Stuhlproben durch Erfassung einzelner Bakterienspezies und/oder -gruppen der Stuhlproben liefern. Letztendlich bleibt festzuhalten, dass kein Effekt der Testgetränke auf die mittlere Gesamtkeimzahl in Stuhlproben der Probandinnen erkennbar war.

5.6 Schlussfolgerungen

Zum Einfluss von Anthocyanen auf die intestinale Mikrobiota des Menschen liegen nur wenige Untersuchungen vor. Bisherige Fragestellungen hierzu konzentrierten sich auf die Zusammensetzung der Stuhlmikrobiota. Die Ergebnisse dieser Studien deuten darauf hin, dass mit dem Verzehr von Polyphenolen durch Wachstumsförderung kommensaler Bakterien und Steigerung der Produktion kurzkettiger Fettsäuren Eigenschaften im Sinne präbiotischer Wirkungen verbunden sein könnten [Lee *et al.*, 2006; Queipo-Ortuño *et al.*, 2012; Tzounis *et al.*, 2011]. Die Wirkungen von Pro- und Präbiotika auf mikrobielle Fermentationseigenschaften im Colon des Menschen wurden bereits mittels $^{15}\text{N}_2$ -LU und Bestimmungen von p-Kresol im Urin untersucht [Cloetens *et al.*, 2008; De Preter *et al.*, 2004; Wutzke *et al.*, 2010].

In der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Einsatz von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU und dem Nachweis spezifischer, bakterieller Metabolite in Atemgas-, Urin- und Stuhlproben erstmals Einflüsse von „kurzfristig“ oder „langfristig“ mit Testgetränken zugeführten Anthocyanen auf mikrobielle Fermentationseigenschaften und -aktivitäten im Colon des Menschen untersucht. Die erhobenen Stuhlparameter, kurzkettige Fettsäuren, pH-Wert und die Gesamtkeimzahl dienen vorrangig als Maß zur Beurteilung saccharolytischer und proteolytischer, mikrobieller Fermentationseigenschaften und Veränderungen im distalen Colon. Zur Beurteilung der mikrobiellen Fermentationsaktivität bzw. des Ausmaßes proteolytischer, bakterieller Fermentation im proximalen Colon diente die $^{13}\text{CO}_2$ -Atemung nach Aufnahme von ^{13}C -LU bzw. die p-Kresol- und ^{15}N -Ausscheidung nach Aufnahme von $^{15}\text{N}_2$ -LU in einzelnen Urinfraktionen. In der vorliegenden Arbeit konnten weder nach einer kurzfristigen noch einer langfristigen Aufnahme der Testgetränke durch die Versuchspersonen eindeutige Einflüsse auf die $^{13}\text{CO}_2$ -Atemung, die renale ^{15}N - und p-Kresol-Ausscheidung, den pH-Wert und die Konzentration kurzkettiger Fettsäuren im Stuhl nachgewiesen werden. Zwar führten die Testgetränke bei kurzfristiger Aufnahme sowohl zu veränderten $^{13}\text{CO}_2$ Atemgaszeitprofilen als auch zu veränderten renalen ^{13}C - und ^{15}N -Ausscheidungen, doch vermutlich beruhten diese Wirkungen weniger auf Änderungen mikrobieller Fermentationseigenschaften und -aktivitäten, als vielmehr auf einer Beeinflussung der oroökalen Transitzeiten.

Auffällig bei allen Parametern, die in der vorliegenden Studie bestimmt wurden, waren die großen inter- und intraindividuellen Variationen trotz des bezüglich Alter und Ernährungsplan recht homogenen Probandenkollektivs. Derartige intra- und interindividuelle Variationen bei Versuchspersonen wurden ebenfalls von anderen Autoren in Untersuchungen zu bakteriellen Umsetzungen von Polyphenolen und damit verbundener Bildung von Abbauprodukten beobachtet [Jiménez-Girón *et al.*, 2013; Gross *et al.*, 2010]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Wirkungen von Polyphenolen bzw.

Anthocyanen auf die Bildung bakterieller Fermentationsprodukte und die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota insbesondere zwischen Personen stark variieren. Da bei Individuen unterschiedliche mikrobielle Enterotypen existieren, erscheint es sinnvoll, diese bei Studien dieser Art zu berücksichtigen. Damit kann eine höhere Homogenität des Probandenkollektivs gewährleistet werden [Robles-Alonso und Guarner, 2013; Zoetendal und de Vos, 2014].

Trotz großer interindividueller Unterschiede konnten in anderen Untersuchungen mit kleineren und heterogeneren Probandenkollektiven und dem Einsatz von $^{15}\text{N}_2$ -LU Effekte einer Pro- und Präbiotikaintervention auf o.g. Parameter gemessen werden [Cloetens *et al.*, 2008; De Preter *et al.*, 2004; Wutzke *et al.*, 2010]. Allerdings wiesen diese Studien z.T. Schwächen wie fehlende Doppelverblindung oder keine „standardisierten“ Ernährungsvorschriften auf.

Die Ergebnisse der Humanstudie I deuten darauf hin, dass die deutlich erhöhte Zufuhr von Polyphenolen bzw. Anthocyanen keinen Effekt auf die bakterielle Fermentationsaktivität und Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota ausübte. Möglicherweise reichten die gegenüber den Kontrollabschnitten mit den Interventionen angestrebten, erhöhten Wirkstoffdosen nicht aus. Eventuell könnte die Bestimmung weiterer Parameter zum Nachweis von Polyphenolwirkungen zusätzliche Informationen liefern. Vor diesem Hintergrund bleibt auch offen, in welchen Maßen individuelle Einflüsse wie körperliche Aktivität, metabolischer Zustand, nicht erfasste Abweichungen innerhalb der vorgegebenen täglichen Ernährungspläne und insbesondere die individuelle intestinale Mikrobiota der Versuchspersonen zur hohen Variabilität bei den Ausscheidungen der mikrobiellen Stoffwechselprodukte beigetragen haben. Für weitere Untersuchungen zu Wirkungen ähnlicher oder auch anderer Nahrungsinterventionen auf die intestinale Mikrobiota sollten die individuellen Zusammensetzungen der intestinalen Mikrobiota der Versuchspersonen stärker einbezogen werden. Allgemeine Aussagen zur Wirkung von Anthocyanen auf die intestinale Mikrobiota können aufgrund starker interindividueller Unterschiede derzeit kaum getroffen werden. Insgesamt erscheint jedoch die Kombination aus mikrobiologischen Stuhluntersuchungen und der Bestimmung bakterieller Fermentationsprodukte in Atemgas-, Urin- und Stuhlproben sowie eventuell weiterer, noch zu etablierender Biomarker geeignet, um vertiefte Erkenntnisse zur Wirkung von Polyphenolen und Anthocyanen auf die Zusammensetzung und Fermentationseigenschaften der Mikrobiota im Colon des Menschen zu gewinnen.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Teilprojektes „Bioverfügbarkeits- und Interventionsstudien beim Menschen“ des BMBF-geförderten Verbundprojektes „Anthocyane in Fruchtsäften aus Beerenobst – *In vivo* Studien zu Bioverfügbarkeit und Wirkungen auf die Mikroflora“ angefertigt.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Anthocyanen in Form von Fruchtsaftgetränken auf bakterielle Fermentationseigenschaften im Colon des Menschen zu untersuchen. Dabei wurde ^{13}C - und ^{15}N -markiertes Lactoseureid als nicht-invasiver Marker eingesetzt. Gleichzeitig war es das Ziel, Informationen über die intestinale Metabolisierung des Markers selbst zu gewinnen. In zwei Humanstudien sollte zwischen einer langfristigen (Humanstudie I) und kurzfristigen Zufuhr (Humanstudie II) von Testgetränken mit unterschiedlichem Anthocyan- und Ballaststoffgehalt unterschieden werden.

Humanstudie I

Die Studie umfasste 3 Versuchsdurchgänge mit jeweils 10-tägigen Washout- und nachfolgenden 14-tägigen Interventionsabschnitten. Sie war als Doppelblind-Studie, randomisiert im Cross-over-Design und Placebo-kontrolliert, angelegt. 30 Probandinnen im Alter von 23-27 Jahren erhielten nach den vorgeschalteten Washoutabschnitten in den Interventionsabschnitten täglich 330 ml eines a) anthocyan- und ballaststoffreichen Smoothies, b) anthocyanreichen und ballaststoffarmen Saftes oder c) anthocyan- und ballaststoffarmen Placebogetränks. Über den gesamten Studienzeitraum ernährten sich die Probandinnen nach vorgegebenen Plänen polyphenol- und ballaststoffarm und verzichteten auf den Verzehr von Lebensmitteln, bei denen eine Beeinflussung der intestinalen Mikrobiota zu erwarten war. Jeweils vor und nach jeder Intervention gab es einen Messtag, an dem den Probandinnen 500 mg ^{13}C -LU und 75 mg $^{15}\text{N}_2$ -LU in einer Trinklösung verabreicht wurden. Anschließend wurden über einen Zeitraum von 36 Stunden in festgelegten Zeitintervallen Atemgas- und Urinproben zur Bestimmung der Anreicherung von ^{13}C im Atem sowie von ^{13}C - und ^{15}N - im Urin gesammelt. Außerdem wurde in diesem Zeitraum die p-Kresol-Ausscheidung im Urin gemessen. Innerhalb von 48 Stunden vor und nach Einnahme des ^{13}C - und ^{15}N -markierten Lactoseureids wurden auch Stuhlproben zur Bestimmung der pH-Werte, der Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren und der Gesamtkeimzahlen genommen.

Die in den Atem- und Urinproben nachgewiesenen ^{13}C - bzw. ^{15}N -Ausscheidungen sind auf mikrobielle Umsetzungen im Colon der Versuchspersonen zurückzuführen.

Die $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofile variierten inter- und intraindividuell stark. Die mittlere $^{13}\text{CO}_2$ - T_{\max} der Probandinnen lag an allen Messtagen zwischen 15-17 Stunden nach Aufnahme von ^{13}C -LU und blieb unbeeinflusst von der Aufnahme der Testgetränke.

Bei den renalen ^{13}C -, ^{15}N - und p-Kresol-Ausscheidungen bestanden ebenso große inter- und intraindividuelle Unterschiede. Im Mittel aller Messungen ließen sich keine Effekte der Testgetränke feststellen.

Die pH-Werte, die Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren und die Gesamtkeimzahlen in den Stuhlproben variierten zwischen den Versuchspersonen stark. Sie liefern keine Nachweise für Einflüsse der Testgetränke auf saccharolytische oder proteolytische Fermentationsaktivitäten im Colon.

Die starken Streuungen der Messwerte in den Atem-, Urin- und Stuhlproben lassen keine differenzierbaren Beziehungen zueinander erkennen.

Insgesamt bleibt zu Humanstudie I festzuhalten, dass die große interindividuelle Variabilität bei den bestimmten Parametern darauf hindeutet, dass die Testgetränke bzw. darin enthaltene Anthocyane und Ballaststoffe die bakterielle Fermentation im Colon individuell sehr unterschiedlich beeinflusst haben könnten, daher im Mittel jedoch keine signifikanten Effekte messbar waren.

Humanstudie II

Humanstudie II wurde als randomisierte Doppelblind-Studie im Cross-over-Design durchgeführt. 10 Versuchspersonen (5 w, 5 m) im Alter von 23-27 Jahren nahmen nach einem 7-tägigen Washoutabschnitt, in dem die gleichen Ernährungsrichtlinien wie in Humanstudie I galten, 330 ml des a) anthocyan- und ballaststoffreichen Smoothies oder des b) anthocyanreichen und ballaststoffarmen Saftes zusammen mit 500 mg ^{13}C -LU und 75 mg $^{15}\text{N}_2$ -LU als Trinklösung auf. Jede Versuchsperson erhielt jeden Saft nach jeweiligem Washoutabschnitt und Messtag zweimal. Außerdem wurde an einem weiteren Messtag der Umsatz von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU im „Nüchternzustand“ der Versuchspersonen ohne Zufuhr der Testgetränke untersucht. Nach Aufnahme der Marker wurden Atemgas- und Urinproben über einen Zeitraum von 30 Stunden in Zeitintervallen gesammelt und die $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung und ^{13}C - und ^{15}N -Ausscheidung im Urin bestimmt.

Die $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofile variierten zwischen den 10 Versuchspersonen stark. Die Zufuhr eines Testgetränkes führte gegenüber dem „Nüchternzustand“ in mehreren Fällen (7) zu früherer, vereinzelt (3) aber auch zu späterer maximaler $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung im Atemgas. Ebenso variierten die renalen ^{13}C - und ^{15}N -Ausscheidungen zwischen den Versuchsteilnehmern. Bei Zufuhr eines der Testgetränke wurde die ^{13}C -Ausscheidung im Urin bei allen, die ^{15}N -Ausscheidung bei sechs Versuchsteilnehmern vermindert.

Durch gleichzeitige Zufuhr der Testgetränke scheint demnach die Metabolisierung von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU beeinflusst worden zu sein. Inwieweit Anthocyane und/oder Ballaststoffe durch die „kurzfristige“ Zufuhr der Testgetränke die Metabolisierung von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU beeinflusst haben oder eine verkürzte orozökale Transitzeit durch erhöhte intestinale Motilität für die beobachteten Effekte verantwortlich war, kann auf Basis der Daten aus der vorliegenden Studie nicht eindeutig entschieden werden. Die unter „nüchternen“ Bedingungen auffällig parallel verlaufenden ^{13}C - und ^{15}N -Ausscheidungsprofile im Urin deuten auf eine zeitlich ähnliche und zugleich unvollständige intestinale Metabolisierung von ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU hin. Zur weiteren Aufklärung sind differenziertere Analysen von ^{13}C - und ^{15}N -Ausscheidungsprodukten im Urin erforderlich. Insgesamt ließen sich mit den in dieser Arbeit gemessenen Parametern weder bei kurzfristiger noch bei langfristiger Aufnahme der Testgetränke Wirkungen der Testgetränke selbst oder darin enthaltener Anthocyane und Ballaststoffe auf bakterielle Fermentationsvorgänge im Colon eindeutig nachweisen. Die große intra- und interindividuelle Variabilität der Messwerte des relativ großen und einheitlich ernährten Probandenkollektivs sollte in Untersuchungen zur weiteren Aufklärung von Anthocyanwirkungen auf die intestinale Mikrobiota beachtet werden. Möglicherweise könnte die Bestimmung weiterer Parameter zusätzliche Informationen liefern.

7 Summary

The presented work is part of the sub-project “Bioavailability and intervention studies in human” of the BMBF funded collaborative research project “Anthocyanins in berry fruit juices - *In vivo* studies on bioavailability and impact on microflora”.

The aim of this study was to investigate the effect of anthocyanins in fruit juices on microbial fermentation in the human colon. Therefore, ^{13}C - and ^{15}N -labelled Lactose ureide (LU) was used as non-invasive marker. Additionally, this study provides information on the intestinal metabolism of the marker itself. Two human studies were compared; a long-term (study I) and a short-term supply (study II) of test beverages with different anthocyanin- and fibre content.

Study I

This study comprises three trial passages with 10-days ‘wash out’ and a following 14-day intervention period each. The procedure was designed as randomised, double-blind study (cross over design and placebo-controlled). 30 female volunteers between the ages of 23 to 27 participated and received after the initial washout phase during the intervention period daily 330 ml of a) anthocyanin- and fibre-rich Smoothies, b) anthocyanin-rich and fibre-poor juice or c) anthocyanin- and fibre-poor placebo beverage. During the entire period, participants were nourished on a polyphenol- and fibre-poor diet and abstained from groceries, which are likely to influence the intestinal microbiota. Before and after each intervention, 500 mg of ^{13}C -LU and 75 mg $^{15}\text{N}_2$ -LU were administered orally. Throughout the following 36 hours breath and urine samples were collected in defined intervals to analyse the enrichment of ^{13}C in breath, as well as ^{13}C - and ^{15}N - in urine. The excretion of ^{13}C - and ^{15}N in breath and urine are used as marker for microbial turnover of the participant. In addition p-Cresol excretion in urine was analysed. Faecal samples to analyse pH-values, concentration of short-chain fatty acids and total bacterial count were taken within 48 hours before and after administration of labelled LU.

The $^{13}\text{CO}_2$ -breathing gas profile showed strong inter- and intra-individual variations. Averaged $^{13}\text{CO}_2\text{-T}_{\text{max}}$ was measured constantly between 15 to 17 hours after administration and was irrespective of the mode of test beverage.

The detected renal ^{13}C -, ^{15}N and p-Cresol excretions showed equally high variations. The averaged measures do not show an effect after consumption of the test substances.

The pH-values, concentration of short-chain fatty acids and total bacterial count of faecal samples resulted in strong variations between individuals and could not confirm any influence of the different beverages on saccharolytic or proteolytic microbial fermentation in

the colon. The observed variance of the parameter in breath-, urine and stool sample do not result in any differential correlations.

Taken together, the high variation of the analysed parameter between individuals suggests that the effect of the anthocyanin- and fibre- containing fruit juices was individually different so that no significant effect was observed on average.

Study II

The second analysed human study was designed as randomized, double-blinded, crossover study, respectively. Ten healthy volunteers (5 female, 5 male), aged 23 to 27 years participated in this study. Following a 7-days washout phase, the candidates ingested 330 ml of a) anthocyanin- and fibre-rich Smoothie or b) anthocyanin-rich and fibre-poor juice beverage together with 500 mg ^{13}C -LU and 75 mg $^{15}\text{N}_2$ -LU. Every volunteer received each test beverage twice after the washout phase. Additionally, ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU metabolism was analysed after fasting. After administration of the test substances, breath and urine samples were collected in defined intervals for 30 hours and the ^{13}C - and ^{15}N -excretion were analysed. The $^{13}\text{CO}_2$ -breathing gas profile revealed high variations between the ten participants. Compared to the fasting situation, the administration of test beverage caused in 7 participants an earlier-, and in 3 cases a delayed $^{13}\text{CO}_2$ -enrichment (T_{max}) in breath. Renal ^{13}C - and ^{15}N -excretion varied respectively. Application of test juices caused a decrease of ^{13}C -excretion in all participants and decreased ^{15}N -excretion was observed in six out of ten individuals.

The simultaneous administration of test beverage seems to influence the metabolism of ^{13}C -LU und $^{15}\text{N}_2$ -LU. It remains unclear to which extent the short-term administration of anthocyanins and/or fibres from the juice effected the increased intestinal motility which caused the decrease of the measured orocecal transit time. The analysed renal ^{13}C - and ^{15}N -excretion profiles at basal/fasting condition argue for a similarly timed-, however incomplete intestinal metabolism of ^{13}C -LU and $^{15}\text{N}_2$ -LU. For further investigations differential and detailed analysis of renal ^{13}C - and ^{15}N -excretion products are needed.

Taken together, the analysed parameter of these studies cannot confirm any effects of the test beverage, the containing anthocyanins or fibres on bacterial fermentation of the human colon, neither after short-term nor after long-term supply. It is worth noting, that despite a relatively large and uniformly feed group of participants, the measured parameters result in high variability, between participants as well as intra-individual. Therefore, more parameters are needed in order to understand the role of anthocyanins on intestinal microbiota.

Literaturverzeichnis

- Abreo K**, Sella M, Gautreaux S, De Smet R, Vogeleere P, Ringoir S, Vanholder R 1997: P-Cresol, a uremic compound, enhances the uptake of aluminum in hepatocytes. *J Am Soc Nephrol*; 8: 935-42.
- Arumugam M**, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poelain J, Quin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J, MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerster KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'ini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P 2011: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*; 473: 174-80.
- Aura AM**, Martin-Lopez P, O'Leary KA, Williamson G, Oksman-Caldentey KM, Poutanen K, Santos-Buelga C 2005: In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *Eur J Nutr*; 44: 133-42.
- Aura AM** 2008: Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochem Rev*; 7: 407-429.
- Ávila M**, Hidalgo M, Sánchez-Moreno C, Pelaez C, Requena T, Pascual-Teresa S 2009: Bioconversion of anthocyanin glycosides by bifidobacteria and lactobacillus. *Food Res Int*; 42: 1453-1461.
- Azad MB**, Konya T, Maughan H, Guttman DS, Field CJ, Chari RS, Sears MR, Becker AB, Scott JA, Kozyrskyi AL, Child Study Investigators 2013: Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 month. *CMAJ*; 185: 385-94.
- Bäckhed F**, Ruth EL, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI 2005: Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*; 307: 1915-20.
- Bagchi D**, Sen CK, Bagchi M, Atalay M 2004: Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry (Mosc)*; 69: 75-80.
- Berthold HK**, Schober P, Scheurlen C, Marklein G, Horré R, Gouni-Berthold I, Sauerbruch T 2009: Use of lactose-[13C]ureide breath test for diagnosis of small bowel bacterial overgrowth: comparison to the glucose hydrogen breath test. *J Gastroenterol*; 44: 944-51.
- Bik EM**, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, Perez-Perez G, Blaser MJ, Relman DA 2006: Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 103: 732-737.

- Bischoff** SC 2009: Probiotika, Präbiotika und Synbiotika. *Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart – New York*.
- Bolca** S, Van de Wiele T, Pssemiers S 2013: Gut metabotypes govern health effects of dietary polyphenols. *Curr Opin Biotechnol*; 24: 220-5.
- Bone** E, Tamm A, Hill M 1976: The production of urinary phenols by gut bacteria and their possible role in the causation of large bowel cancer. *Am J Clin Nutr*; 29: 1448-54.
- Bub** A, Watzl B, Heeb D, Rechkemmer G, Briviba K 2001: Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *Eur J Nutr*; 40: 113-20.
- Cardona** F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI 2013: Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J Nutr Biochem*; 24: 1415-22.
- Chow** J, Lee SM, Shen Y, Khosravi A, Mazmanian SK 2010: Host-bacterial symbiosis in health and disease. *Adv Immunol*; 107: 243-74.
- Claesson** MJ, O'Sullivan O, Wang Q, Nikkilä J, Marchesi JR, Smidt H, de Vos WM, Ross RP, O'Toole PW 2009: Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PloS One*; 4: e6669.
- Claesson** MJ, Cusacks S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, Marchesi JR, Falush D, Dinan T, Fitzgerald G, Stanton C, van Sinderen D, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, Henry C, O'Mahony D, Fitzgerald AP, Shanahan F, Twomey C, Hill C, Ross RP, O'Toole PW 2011: Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 108: 4586-91.
- Clavel** T, Henderson G, Engst W, Doré J, Blaut M 2006: Phylogeny of human intestinal bacteria that activate the dietary lignan secoisolariciresinol diol glucoside. *FEMS Microbiol Ecol*; 55: 471-8.
- Clifford** MN 2000: Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*; 80: 1063-72.
- Clifford** MN 2004: Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med*; 70: 1103-14.
- Cloetens** L, De Preter V, De Loor H, Rutgeerts P, Verbeke K 2008a: Does the biomarker 15N-lactoseureide allow to estimate the site of fermentation of resistant starch? *Eur J Nutr*; 47: 217-23.
- Cloetens** L, De Preter V, Swennen K, Broekert WF, Courtin CM, Delcour JA, Rutgeerts P, Verbeke K 2008b: Dose-response effect of arabinoxyloligosaccharides on gastrointestinal motility and on colonic bacterial metabolism in healthy volunteers. *J Am Coll Nutr*; 27: 512-8.
- Crozier** A, Jaganath IB, Clifford MN 2009: Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*; 26: 1001-43.

- David** LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ 2013: Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*.
- Davila** AM, Blachier F, Gotteland M, Andriamihaja M, Benetti PH, Sanz Y, Tomé D 2013: Reprint of „Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host. *Pharmacol Res*; 69: 114-26.
- Day** AJ, Cañada FJ, Díaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G 2000: Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett*; 468: 166-70.
- De Graaf** AA, Venema K 2008: Gaining insight into microbial physiology in the large intestine: a special role for stable isotopes. *Adv Microb Physiol*; 53: 73-168.
- De Loor** H, Bammens B, Evenepoel P, De Preter V, Verbeke K 2005: Gas chromatographic-mass spectrometric analysis for measurement of p-cresol and its conjugated metabolites in uremic and normal serum. *Clin Chem*; 51: 1535-8.
- De Preter** V, Geboes K, Verbrugghe K, De Vuyst L, Vanhoutte T, Huys G, Swings J, Pot B, Verbeke K 2004: The in vivo use of stable isotope-labelled biomarkers lactose-[¹⁵N]ureide and [2H₄]tyrosine to assess the effects of pro- and prebiotics on the intestinal flora of healthy human volunteers. *Br J Nutr*; 92: 439-46.
- De Preter** V, Verbeke K 2006: Evaluation of the necessity of induction for lactose-[¹⁵N, ¹⁵N]-ureide to study the colonic ammonia metabolism. *Scand J Gastroenterol*; 41: 396-400.
- De Preter** V, Vanhoutte T, Huys G, Swings J, De Vuyst L, Rutgeerts P, Verbeke K 2007: Effects of *Lactobacillus casei* Shirota, *Bifidobacterium breve*, and oligofructose-enriches inulin on colonic nitrogen-protein metabolism in healthy humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 292: G358-68.
- De Preter** V, Vanhoutte T, Huys G, Swings J, Rutgeerts P, Verbeke K 2008: Baseline microbiota activity and initial bifidobacteria counts influence responses to prebiotic dosing in healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther*; 27: 504-13.
- De Preter** V, Hamer HM, Windey K, Verbeke K 2011: The impact of pre- and/or probiotics on human colonic metabolism: does it affect human health? *Mol Nutr Food Res*; 55: 46-57.
- De Preter** V, Houben E, Windey K, Luybaerts A, Verbeke K 2011: Analysis of the urinary glucose-[¹⁵N, ¹⁵N]-ureide content in the study of the lactose-[¹⁵N, ¹⁵N]-ureide metabolism in healthy humans. *Eur J Clin Nutr*; 65: 959-64.
- De Smet** R, Van Kaer J, Van Vlem B, De Cubber A, Brunet P, Lameire N, Vanholder R 2003: Toxicity of free p-cresol: a prospective and cross-sectional analysis. *Clin Chem*; 49: 470-8.
- DGE**, ÖGE, SGE, SVE 2012: Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 1. Auflage, 4. Korrigierter Nachdruck 2012, Neuer Umschau Buchverlag.

- Dou L**, Bertrand E, Cerini C, Faure V, Sampol J, Vanholder R, Berland Y, Brunet P 2004: The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. *Kidney Int*; 65: 442-51.
- Eckburg PB**, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA 2005: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*; 308: 1635-1638.
- Fallani M**, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, Aquilera M, Khanna S, Gil A, Edwards CA, Doré J, Other members of the INFABIO Team 2010: Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 51: 77-84.
- Fallani M**, Amarri S, Uusijarvi A, Adam R, Khanna S, Aguilera M, Gil A, Vieites JM, Norin E, Young D, Scott JA, Doré J, Edwards CA, INFABIO team 2011: Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiology*; 157: 1385-92.
- Faria A**, Pestana D, Azevedo J, Martel F, de Freitas V, Azevedo I, Mateus N, Calhau C 2009: Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells – Putative involvement of GLUT2. *Mol Nutr Food Res*; 53: 1430-7.
- Favier CF**, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD 2002: Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol*; 68: 218-26.
- Felgines C**, Texier O, Besson C, Fraisse D, Lamaison JL, Rémésy C 2002: Blackberry anthocyanins are slightly bioavailable in rats. *J Nutr*; 132: 1249-53.
- Fleschhut J** 2004: Untersuchungen zum Metabolismus, zur Bioverfügbarkeit und zur antioxidativen Wirkung von Anthocyanen. *Dissertation*; Technische Universität Karlsruhe.
- Fleschhut J**, Kratzer F, Rechkemmer G, Kulling SE 2006: Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur J Nutr*; 45: 7-18.
- Flint HJ** 2012: The impact of nutrition on the human microbiome. *Nutr Rev*; 70: 10-3.
- Garcia-Alonso M**, Minihane AM, Rimbach G, Riva-Gonzalo JC, de Pascual-Teresa S 2009: Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. *J Nutr Biochem*; 20: 521-9.
- Geboes KP**, De Preter V, Luybaerts A, Bammens B, Evenepoel P, Ghoss Y, Rutgeerts P, Verbeke K 2005: Validation of lactose-[15N, 15N]ureide as a tool to study colonic nitrogen metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 288: G994-9.
- Geboes KP**, De Hertogh G, De Preter V, Luybaerts A, Bammens B, Evenepoel P, Ghoss Y, Geboes K, Rutgeerts P, Verbeke K 2006: The influence of inulin on the absorption of nitrogen and the production of metabolites of protein fermentation in the colon. *Br J Nutr*; 96: 1078-86.

- Geypens** B, Claus D, Evenepoel P, Hiele M, Maes B, Peeters M, Rutgeerts P, Ghooos Y 1997: Influence of dietary protein supplements on the formation of bacterial metabolites in the colon. *Gut*; 41: 70-76.
- Gosh** DK 2005: Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts in biology and medicine: biochemical, cellular and medicinal properties. *Curr Topics Nutraceut Res*; 3: 113-124.
- Gross** G, Jacobs DM, Peters S, Possemiers S, van Duynhoven J, Vaughan EE, van de Wiele T 2010: In vitro bioconversion of polyphenols from black tea and red wine/grape juice by human intestinal microbiota displays strong interindividual variability. *J Agric Food Chem*; 58: 10236-46.
- Grzonka** C 2008: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zum Nachweis bakterieller Erreger bei Mukoviszidose. *Dissertation*; Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Hamer** HM, De Preter V, Windey K, Verbeke K 2012: Functional analysis of colonic bacterial metabolism: relevant to health? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 302: G1-G9.
- Harmsen** HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW 2000: Analysis of intestinal flora development in breast-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 30: 61-7.
- He** J, Giusti MM 2010: Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annu Rev Food Sci Technol*; 1: 163-87.
- Heine** WE, Berthold HK, Klein PD 1995: A novel stable isotope breath test: ¹³C-labeled glycosyl ureides used as noninvasive markers of intestinal transit time. *Am J Gastroenterol*; 90: 93-8.
- Hidalgo** M, Oruna-Concha MJ, Kolida S, Walton GE, Kallithraka S, Spencer JP, de Pascual-Teresa S 2012: Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth. *J Agric Food Chem*; 60: 3882-90.
- HMP** (Human Microbiome Project) 2014: Human Microbiome Project. Zugriff am: 28.03.2014. Verfügbar unter <http://www.hmpdacc.org/>
- Hooper** LV, Midtvedt, Gordon JI 2002: How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr*; 22: 283-307.
- Hopkins** MJ, Sharp R, Macfarlane GT 2001: Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut*; 48: 198-205.
- Hughes** R, Magee EA, Bingham S 2000: Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Curr Issues Intest Microbiol*; 1: 51-8.
- Huurre** A, Kalliomäki M, Rautava S, Rinne M, Salminen S, Isolauri E 2008: Mode of delivery – effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology*; 93: 236-40.
- Ichiyagani** T, Rahman MM, Kashiwada Y, Ikeshiro Y, Shida Y, Hatano Y, Matsumoto H, Hirayama M, Tsuda T, Konishi T 2004: Absorption and metabolism of delphinidin 3-O-beta-D-glucopyranoside in rats. *Free Radic Biol Med*; 36: 930-7.

- Ichiyagani** T, Shida Y, Rahman MM, Hatano Y, Matsumoto H, Hirayama M, Konishi T 2005: Metabolic pathway of cyanidine 3-O-beta-D-glucopyranoside in rats. *J Agric Food Chem*; 53: 145-50.
- Jackson** AA, Bundy R, Hounslow A, Murphy JL, Wootton SA 1999: Metabolism of lactose-[13C]ureide and lactose-[15N, 15N]ureide in normal adults consuming a diet marginally adequate in protein. *Clin Sci (Lond)*; 97: 547-55.
- Jackson** AA, Gibson NR, Bundy R, Hounslow A, Millward DJ, Wootton SA 2004: Transfer of (15)N from oral lactose-ureide to lysine in normal adults. *Int J Food Sci Nutr*; 55: 455-62.
- Janeway** CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ 2004: Immunobiology. 6th (sixth) Edition. New York: Garland Science.
- Jakobsdottir** G, Blanco N, Xu J, Ahrné S, Molin G, Sterner O, Nyman M 2013: Formation of short-chain Fatty acids, excretion of anthocyanins, and microbial diversity in rats fed blackcurrants, blackberries, and raspberries. *J Nutr Metab*;
- Jenkins** DJ, Vuksan V, Kendall CW, Würsch P, Jeffcoat R, Waring S, Mehling CC, Vidgen E, Augustin LS, Wong E 1998: Physiological effects of resistant starches on fecal bulk, short chain fatty acids, blood lipids and glycemic index. *J Am Coll Nutr*; 17: 609-16.
- Jiménez-Girón** A, Queipo-Ortuño MI, Boto-Ordóñez M, Muñoz-González I, Sánchez-Patán F, Monagas M, Martín-Álvarez PJ, Murri M, Tinahones FJ, Andrés-Lacueva C, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV 2013: Comparative Study of Microbial-Derived Phenolic Metabolites in Human Feces after Intake of Gin, Red Wine, and Dealcoholized Red Wine. *J Agric Food Chem*, 61: 3909-3915.
- Jin** Y, Alimbetov D, George T, Gordon MH, Lovegrove JA 2011: A randomized trial to investigate the effects of acute consumption of a blackcurrant juice drink on markers of vascular reactivity and bioavailability of anthocyanins in human subjects. *Eur J Clin Nutr*; 65: 849-56.
- Karlsruher Institut für Technologie** 2014: Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH). Zugriff am: 11.03.2014. Verfügbar unter http://www.google.de/imgres?imgurl=%20http://%20wasserchemie.ebi.kit.edu/img/content/FISH-Amman.gif&imgrefurl=http://wasserchemie.ebi.kit.edu/1046.php&h=468&w=760&tbnid=tfOK-MibTdy7TM:&tbnh=90&tbnw=%20146&zoom=1&usq=__LFQamtZa0wVHF71Lu2lvUF3kiA4=&docid=qKVy8jjzLeLORM&sa=X&ei=WgEsU6WLN5PwhQfIqICwCg&sqi=2&ved=0CEkQ9QEwAw&dur=340
- Kay** CD, Mazza G, Holub BJ, Wang J 2004: Anthocyanins metabolites in human urine and serum. *Br J Nutr*; 91: 933-42.
- Kay** CD 2006: Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. *Nutr Res Rev*; 19: 137-46.
- Kay** CD, Kroon PA, Cassidy A 2009: The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products. *Mol Nutr Food Res*; 53: 92-101.

- Kemperman** RA, Bolca S, Roger LC, Vaughan EE 2010: Novel approaches for analyzing gut microbes and dietary polyphenols: challenges and opportunities. *Microbiology*; 156: 3224-3231.
- Keppler** K, Humpf HU 2005: Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg Med Chem*; 13: 5195-5205.
- Kottra** G, Daniel H 2007: Flavonoid glycosides are not transported by the human Na⁺/glucose transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, but effectively inhibit electrogenic glucose uptake. *J Pharmacol Exp Ther*; 322: 829-35.
- Kowalkowska** J, Slowinska MA, Slowinski D, Dlugosz A, Niedzwiedzka E, Wadolowska L 2013: Comparison of a full food-frequency questionnaire with the three-day unweighted food records in young polish adult women: implications for dietary assessment. *Nutrients*; 5: 2747-76.
- Krisch** J, Galgózy L, Tögyesi M, Papp T, Vágvolgyi C 2008: Effect of fruit juices and pomace extracts on the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Acta Biol*; 52: 267-270.
- Lee** HC, Jenner AM, Low CS, Lee YK 2006: Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res Microbiol*; 157: 876-84.
- Leonel** AJ, Alvarez-Leite JI 2012: Butyrate: implications for intestinal function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*; 15: 474-9.
- Ley** RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI 2005: Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102: 11070-11075.
- Ley** RE, Peterson DA, Gordon JI 2006: Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*; 124: 837-848.
- MacFarlane** GT, Macfarlane LE 2009: Acquisition, evolution and maintenance of the normal gut microbiota. *Dig Dis*; 27: 90-8.
- Mai** V, Katki HA, Harmsen H, Gallaher D, Schatzkin A, Baer DJ, Clevidence B 2004: Effects of a controlled diet and black tea drinking on the fecal microflora composition and the fecal bile acid profile of human volunteers in a double-blinded randomized feeding study. *J Nutr*; 134: 473-8.
- Mai** V, Ukhanova M, Baer DJ 2010: Understanding the Extent and Sources of Variation in the Gut Microbiota Studies; a Prerequisite for Establishing Associations with disease. *Diversity*; 2: 1085-1096.
- Manach** C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L 2004: Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*; 79: 727-47.
- Mandar** R, Mikelsaar M 1996: Transmission of mother's microflora to the newborn at birth. *Biol Neonate*; 69: 30-35.

- Matamoros** S, Gras-Leguen C, Le Vacon F, Potel G, de La Cochetiere MF 2013: Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol*; XX: 1-7.
- Matsumoto** H, Inaba H, Kishi M, Tominaga S, Hirayama M, Tsuda T 2001: Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyaniding 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as intact forms. *J Agric Food Chem*; 49: 1546-51.
- McGhie** TK, Walton MC 2007: The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Mol Nutr Food Res*; 51: 702-13.
- Meyer** TW, Hostetter TH 2012: Uremic solutes from colon microbes. *Kidney Int*; 81: 949-54.
- Minekus** M, Smeets-Peeters M, Bernalier A, Marol-Bonnin S, Havenaar R, Marteau P, Alric M, Fonty G, Huis in 't Veld JH 1999: A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Appl Microbiol Biotechnol*; 53: 108-14.
- Mitsuoka** T 1992: Intestinal flora and aging. *Nutr Rev*; 50: 438-46.
- Mohr** C, Heine WE, Wutzke KD 1999: Clostridium inocuum: a glucoseureide-splitting inhabitant of the human intestinal tract. *Biochim Biophys Acta*; 1472: 550-4.
- Molan** AL, Lila AA, Mawson J, De S 2009: In vitro and in vivo evaluation of the prebiotic activity of water-soluble blueberry extracts. *World J Microbiol Biotechnol*; 25: 1243-1249.
- Moore** AM, Munck C, Sommer MO, Dantas G 2012: Functional metagenomic investigations of the human intestinal microbiota. *Front Microbiol*;
- Morrison** DJ, Dodson B, Preston T, Weaver LT 2003: Gastrointestinal handling of glycosyl [13C]ureides. *Eur J Clin Nutr*; 57: 1017-24.
- Nicholson** JK, Holmes E, Kinross J, Burcellin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S: 2012: Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*; 336: 1262-7.
- Nielsen** IL, Dragsted LO, Ravn-Haren G, Freese R, Rasmussen SE 2003: Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J Agric Food Chem*; 51: 2813-20.
- NIH** (National Institute of Health) 2014: Human Microbiome Project. Zugriff am: 28.03.2014. Verfügbar unter <http://commonfund.nih.gov/hmp/index>
- Nilsson** AC, Östman EM, Knudsen KE, Holst JJ, Björck IM 2010: A cereal-based evening meal rich in indigestible carbohydrates increases plasma butyrate the next morning. *J Nutr*; 140: 1932-6.
- Nyangale** EP, Mottram DS, Gibson GR 2012: Gut microbial activity, implications for health and disease: the potential role of metabolite analysis. *J Proteome Res*; 11: 5573-85.
- O'Hara** AM, Shanahan F 2006: The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*; 7: 688-93.

- Oligashi S**, Sudo K, Kobayashi D, Takahashi T, Asahara T, Nomoto K, Onodera H 2013: Changes of intestinal microbiota, short chain fatty acids, and fecal pH in patients with colorectal cancer. *Dig Dis Sci*; 58: 1717-26.
- Palmer C**, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO 2007: Development of the human infant intestinal microbiota. *PloS Biol*; 5: e177.
- Pandolf SJ** 2008: Integrated response to a meal. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*; 32: 564-6.
- Pang X**, Hua X, Yang Q, Ding D, Che C, Cui L, Jia W, Bucheli P, Zhao L 2007: Inter-species transplantation of gut microbiota from human to pigs. *ISME J*; 1:156-62.
- Parkar SG**, Trower TM, Stevenson DE 2013: Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. *Anaerobe*; 23: 12-19.
- Passamonti S**, Vrhovsek U, Mattivi F 2002: The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochem Biophys Res Commun*; 296: 631-6.
- Passamonti S**, Vrhovsek U, Vanzo A, Mattivi F 2003: The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Lett*; 544: 210-3.
- Patel KP**, Luo FJ, Plummer NS, Hostetter TH, Meyer TW 2012: The production of p-cresol sulfate and indoxyl sulfate in vegetarians versus omnivores. *Clin J Am Soc Nephrol*; 7: 982-8.
- Pearson JR**, Gill CI, Rowland IR 2009: Diet, fecal water, and colon cancer – development of a biomarker. *Nutr Rev*; 67: 509-26.
- Priebe MG**, Wachters-Hagedoorn RE, Stellaard F, Heiner AM, Elzinga H, Vonk RJ 2004: Oro-cecal transit time: influence of a subsequent meal. *Eur J Clin Invest*; 34: 417-21.
- Prior RL**, Wu X 2006: Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radic Res*; 40: 1014-28.
- Puertollano E**, Kolida S, Yaqoob P 2014: Biological significance of short-chain fatty acid metabolism by the intestinal microbiome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*; 17: 139-44.
- Puuponen-Pimia R**, Nohynek L, Hartmann-Schmidlin S, Kähkönen M, Heinonen M, Määttä-Riihinen K, Oksman-Caldentey KM 2005: Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *J Appl Microbiol*; 98: 991-1000.
- Queipo-Ortuño MI**, Boto-Ordóñez M, Murri M, Gomez-Zumaquero JM, Clemente-Postigo M, Estruch R, Cardona Diaz F, Andrés-Lacueva C, Tinahones FJ 2012: Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *Am J Clin Nutr*; 95: 1323-34.

- Quin J**, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Paslier DL, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Quin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J 2010: A human gut microbial gene catalog establishes by metagenomic sequencing. *Nature*; 464: 59-64.
- Rastmanesh R** 2011: High polyphenol, low probiotic diet for weight loss because of intestinal microbiota interaction. *Chem Biol Interact*; 189: 1-8.
- Rechner AR**, Smith MA, Kuhnle G, Gibson GR, Debnam ES, Srai SK, Moore KP, Rice-Evans CA 2004: Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic Biol Med*; 36: 212-25.
- Robles-Alonso V**, Guarner F 2013: Progress in the knowledge of the intestinal human microbiota. *Nutr Hosp*; 28: 553-7.
- Rochet V**, Rigottier-Gois L, Rabot S, Doré J 2004: Validation of fluorescent in situ hybridization combined with flow cytometry for assessing interindividual variation in the composition of human fecal microflora during long-term storage of samples. *J Microbiol Methods*; 59: 263-70.
- Ruemmele FM**, Heine WE, Keller KM, Lentze MJ 1997: Metabolism of glycosyl ureides by human intestinal brush border enzymes. *Biochim Biophys Acta*; 1336: 275-80.
- Sakata S**, Tonooka T, Ishizeki S, Takada M, Sakamoto M, Fukuyama M, Benno Y 2005: Culture-independent analysis of fecal microbiota in infants, with special reference to Bifidobacterium species. *FEMS Microbiol Lett*; 243: 417-423.
- Sánchez-Patán F**, Cueva C, Monagas M, Walton GE, Gibson GR, Quintanilla-López JE, Lebrón-Aguilar R, Martín-Álvarez PJ, Moreno-Arribas MV, Bartolomé B 2012: In vitro fermentation of red wine extracts by human gut microbiota: changes in microbial groups and formation of phenolic metabolites. *J Agric Food Chem*; 60: 2136-47.
- Saulnier DM**, Kolida S, Gibson GR 2009: Microbiology of the human intestinal tract and approaches for its dietary modulation. *Curr Pharm Des*; 15: 1403-1414.
- Scalbert A**, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L 2005: Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*; 45: 287-306.
- Schoorl MN** 1903: Les uréides des sucres. *Rec Trav Chim PayBas*; 22: 31-77.
- Schwiertz A**, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, Hardt PD 2010: Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*; 18: 190-5.
- Scott KP**, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH 2013: The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res*; 69: 52-60.
- Sekirov I**, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB 2010: Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*; 90: 859-904.

- Selma** MV, Espín JC, Tomás-Barberán FA 2009: Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J Agric Food Chem*; 57: 6485-501.
- Suzuki** K, Benno Y, Mitsuoka T, Takebe S, Kobashi K, Hase J 1979: Urease-producing species of intestinal anaerobes and their activities. *Appl Environ Microbiol*; 37: 379-82.
- Swidsinski** A, Loening-Baucke V, Lochs H, Hale LP 2005: Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: A fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol*; 11: 1131-40.
- Talavéra** S, Felgines C, Texier O, Besson C, Lamaison JL, Rémésy C 2003: Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *J Nutr*; 133: 4178-82.
- Talavéra** S, Felgines C, Texier O, Besson C, Gil-Izquierdo A, Lamaison JL, Rémésy C 2005: Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *J Agric Food Chem*; 53: 3902-8.
- Tannock** GW 1995: Normal microflora: An introduction to microbes inhabiting the human body. *Chapman & Hall*; London.
- Thompson** FE, Byers T 1994: Dietary Assessment Resource Manual. *J. Nutr.*; 124: 2245-2317.
- Topping** DL, Clifton PM 2001: Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*; 81: 1031-64.
- Tremalori** V, Bäckhed F 2012: Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*; 489: 242-9.
- Tuovinen** JJ, Salonen A, Nikkilä J, Immonen O, Kekkonen R, Lahti L, Palva A, deVos WM 2011: Intestinal microbiota in healthy adults: temporal analysis reveals individual and common core and relation to intestinal symptoms. *PloS One*; 6: e23035.
- Turnbaugh** PJ, Hamady M, Yatsunenkov T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI 2009: A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*; 457: 480-484.
- Tzounis** X, Rodriguez-Mateos A, Vulevic J, Gibson GR, Kwik-Urbe C, Spencer JP 2011: Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *Am J Clin Nutr*; 93: 62-72.
- Vahtovuo** J, Korkeamäki M, Munukka E, Viljanen MK, Toivanen P 2005: Quantification of bacteria in human feces using 16S rRNA-hybridization, DNA-staining and flow cytometry. *J Microbiol Methods*; 63: 276-86.
- Vanholder** R, Bammens B, de Loor H, Glorieux G, Meijers B, Schepers E, Massy Z, Evenepoel P 2011: Warning: the unfortunate end of p-cresol as a uremic toxin. *Nephrol Dial Transplant*; 26: 1464-7.

- Vendrame S**, Guglielmetti S, Riso P, Arioli S, Klimis-Zacas D, Porrini M 2011: Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases bifidobacteria in the human gut. *J Agric Food Chem*; 59: 12815-20.
- Venema K**, Minekus M, Havenaar R 2004: Advanced in vitro models of the gastro-intestinal tract: novel tools to study functionality of dietary fibres. *Dietary Fibre Bioactive Carbohydrates for Food and Feed*; 99-112. Wageningen.
- Vipperla K**, O'Keefe SJ 2012: The microbiota and its metabolites in colonic mucosal health and cancer risk. *Nutr Clin Pract*; 27: 624-35.
- Vitaglione P**, Donnarumma G, Napolitano A, Galvano F, Gallo A, Scalfi L, Fogliano V 2007: Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyaniding-glucosides. *J Nutr*; 137: 2043-8.
- Walker AW**, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, Brown D, Stares MD, Scott P, Bergerat A, Louis P, McIntosh F, Johnstone AM, Lobley GE, Parkhill J, Flint HJ 2011: Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J*; 5: 220-30.
- Wallner G**, Erhart R, Amann R 1995: Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. *Appl Environ Microbiol*; 61: 1859-66.
- Walton GE**, Lu C, Trogh I, Arnaut F, Gibson GR 2012: A randomised, double-blind, placebo controlled cross-over study to determine the gastrointestinal effects of consumption of arabinoxylan-oligosaccharides enriched bread in healthy volunteers. *Nutr J*; 11: 36.
- Wang LS**, Stoner GD 2008: Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett*; 269: 281-90.
- Watzl B**, Briviba K, Rechkemmer G 2002: Anthocyane. *Ernährungs Umschau* 4: 148-150.
- WHO** 2004: The international classification of adult underweight, overweight and obesity according to BMI. Verfügbar unter: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html (Zugriff am 29.07.2013).
- Wilson M** 2005: Microbial inhabitants of humans: Their ecology and role in health and disease. *Cambridge University Press*; Cambridge.
- Windey K**, De Preter V, Verbeke K 2012: Relevance of protein fermentation to gut health. *Mol Nutr Food Res*; 56: 184-96.
- Woodmansey EJ** 2007: Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol*; 102: 1178-86.
- Wu X**, Pittman HE 3rd, Prior RL 2004: Pelargonidin is absorbed and metabolized differently than cyaniding after marionberry consumption in pigs. *J Nutr*; 134: 2603-10.
- Wu X**, Pittman HE 3rd, McKay S, Prior RL 2005: Aglycones and sugar moieties alter anthocyanin absorption and metabolism after berry consumption in weanling pigs. *J Nutr*; 135: 2417-24.

- Wu X**, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL 2006: Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J Agric Food Chem*; 54: 4069-75.
- Wutzke KD**, Heine WE, Plath C, Leitzmann P, Radke M, Mohr C, Richter I, Gülzow HU, Hobusch D 1997: Evaluation of oro-coecal transit time: a comparison of the lactose-[13C, 15N]ureide 13CO₂- and the lactulose H₂-breath test in humans. *Eur J Clin Nutr*; 51: 11-9.
- Wutzke KD**, Glasenapp B 2004: The use of 13C-labelled glycosyl ureides for evaluation of oro-caecal transit time. *Eur J Clin Nutr*; 58: 568-72.
- Wutzke KD** Schütt M 2007: The duration of enzyme induction in oro-caecal transit time measurements. *Eur J Clin Nutr*; 61: 1162-6.
- Wutzke KD**, Mix J 2010: The metabolic fate of doubly labeled lactose-[13C, 15N]ureide after pre-dosing with different ureides. *Eur J Clin Nutr*; 64: 733-8.
- Wutzke KD**, Lotz M, Zipprich C 2010: The effect of pre- and probiotics on the colonic ammonia metabolism in humans as measured by lactose-[15N₂]ureide. *Eur J Clin Nutr*; 64: 1215-21.
- Yakult**: Probiotika Wirkungen auf die Gesundheit und Einsatz in der Praxis. Fachinformationen, Zugriff am: 10.02.2013. Verfügbar unter http://www.yakult.de/science/broschuere_probiotika.pdf
- Zhao G**, Nyman M, Jönsson JA 2006: Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomed Chromatogr*; 20: 674-82.
- Zoetendal EG**, Ben-Amor K, Harmsen HJ, Schut F, Akkermans AD, de Vos WM 2002: Quantification of uncultured Ruminococcus obeum-like bacteria in human fecal samples by fluorescent in situ hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes. *Appl Environ Microbiol*; 68: 4225-32.
- Zoetendal EG**, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR 2004: Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr*; 134: 465-72.
- Zoetendal EG**, de Vos WM 2014: Effect of diet on the intestinal microbiota and its activity. *Curr Opin Gastroenterol*; 30: 189-95.

Anhang

A-1 Anthropometrische Daten der Versuchsteilnehmer aus Humanstudie I

Probandin	Alter	Größe	Gewicht	BMI
10	25	1,50	44	19,6
11	25	1,63	70	26,3
12	27	1,80	71	21,9
13	23	1,68	58	20,5
14	23	1,63	54	20,3
15	25	1,60	55	21,5
16	24	1,60	53	20,7
17	26	1,63	55	20,7
18	27	1,67	78	28,0
19	24	1,71	58	19,8
20	24	1,64	57	21,2
21	23	1,70	60	20,8
22	24	1,76	63	20,3
23	24	1,64	52	19,3
24	27	1,67	55	19,7
25	27	1,70	55	19,0
26	24	1,64	66	24,5
27	24	1,73	70	23,4
28	25	1,69	52	18,2
29	25	1,72	69	23,3
30	25	1,65	70	25,7
31	23	1,70	59	20,4
32	24	1,73	60	20,0
33	24	1,55	50	20,8
34	23	1,67	57	20,4
35	26	1,81	63	19,2
36	23	1,60	50	19,5
37	24	1,72	56	18,9
38	25	1,72	56	18,9
39	26	1,70	57	19,7

A-2 Ernährungsrichtlinien der Versuchspersonen aus Humanstudie I und II

**ANTHONIA-Studie****Wirkung von Anthocyanen auf die Darmflora****Welche Lebensmittel sind während der Studie prinzipiell erlaubt?**

Fleisch, Wurst, Fisch Alle Fleischsorten und Fleischwaren (außer mariniertes Fleisch mit Paprikapulver u.ä.) Alle Wurst und Wurstwaren (außer Paprikawurst, Peperonisalami u. ä.) Fisch, Krusten- und Weichtiere (außer Fischwaren in Tomatensoße u. ä.)	Milch, Milchprodukte, Käse, Eier Milch, Joghurt und andere Milchprodukte (ohne Müsli/Obst/Kakao/ Nüsse u. ä.) Quark und Käse (ohne Obst/Tomaten/Paprika/Nüsse u. ä.) Eier	Gemüse Grüne Blattsalate Gurken Zucchini Fenchel grüne Bohnen Erbsen Sellerie Kohlrabi Pilze Obst s. nächste Seiten!
Beilagen und Brot Nudeln, Reis, etc. (kein Vollkorn) Kartoffeln und -produkte Brot, Brötchen (kein Vollkorn)	Fette, Gewürze u. ä. Tierische Fette Salz/Pfeffer Heller Essig Kräuter Knoblauch Senf Mayonnaise <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 10px;"> } als Gewürz </div>	Süßigkeiten u. ä. Kekse, Kuchen (kein Vollkorn, ohne dunkle Schokolade/rote Früchte) Salzgebäck, Kracker (kein Vollkorn) Weiße Schokolade Zucker, Honig Eis (ohne Obst/dunkle Schokolade/Nüsse u. ä.) Kaugummi

Hinweis zu Getränken:**Ohne Einschränkungen sind erlaubt:**

- Wasser (still oder mit Kohlensäure)
- Wasser mit Aroma
- Aufgussgetränke (Kamille, Kräuter, Brennnessel, Fenchel, Pfefferminze)
- Kaffee-Ersatz, z. B. Caro-Kaffee
- Limonaden (außer z. B. rote Bionade)



ANTHONIA-Studie**Wirkung von Anthocyanen auf die Darmflora****Welche Lebensmittel sind während der Studie eingeschränkt erlaubt?**

Milch, Milchprodukte Milch, Joghurt und andere Milchprodukte mit Obst, Nüssen u. ä. (ohne rote Früchte)	Gemüse gelbe und grüne Paprika Porree Spinat Blumenkohl Broccoli Zwiebeln (keine roten Zwiebeln)	Obst Bananen Birnen Helle Trauben Äpfel (max. 1 Stück/Tag) Pfirsiche, Aprikosen (max. 1 Stück/Tag) Kiwis Ananas
Backwaren und Cerealien Frühstückscerealien (kein Vollkorn/ohne rote Früchte/dunkle Schokolade/Kleie)	Fette, Gewürze Pflanzliche Fette und Öle Paprikapulver Chilipulver Cayennepfeffer Currypulver	Süßigkeiten u.ä. Helle Schokolade (mit niedrigem Kakaoanteil) Eis mit Obst, Nüssen u. ä. (ohne rote Früchte/dunkle Schokolade) Nüsse Marmelade/Gelee (ohne rote Früchte)

- Obst und Gemüse wenn möglich vor dem Verzehr schälen, v. a. wenn mehrere Portionen pro Tag verzehrt werden; auf rote Früchte (siehe nächste Seite) verzichten
- Äußere Blätter bei Salaten möglichst nicht verzehren
- Bei Getreideprodukten auf Vollkornprodukte verzichten
- Aufgeführte Gewürze und ähnliche Gewürzmischungen sparsam verwenden

Hinweis zu Getränken:**Bitte meiden Sie:**

- Schwarzen Tee
- Grünen oder weißen Tee
- Rooibos Tee
- Früchtetee
- Kaffee
- Alkoholische Getränke (Bier, Wein, Schnaps, Likör)

Pro Tag sind erlaubt:

1 Tasse Tee **ODER** 1 Tasse Kaffee **ODER** 1 Glas Bier **ODER** 1 Glas Weißwein
(KEIN Rotwein!!!)



ANTHONIA-Studie

Wirkung von Anthocyanen auf die Darmflora

Bitte verzichten Sie auf die folgenden Lebensmittel:

Produkte, die Anthocyane (rot-blau-violette Farbstoffe) enthalten, zum Beispiel:

Beeren Blaubeeren Brombeeren Cranberries Erdbeeren Heidelbeeren Himbeeren Johannisbeeren Preiselbeeren	Weitere Obstsorten Kirschen Rote Trauben Granatapfel Pflaumen Zwetschgen Wassermelone	Fruchtzubereitungen, Kuchen, Süßigkeiten u. ä. Rote Marmelade/Gelees Kuchen Joghurts Eis, Desserts Müsli, Müsliriegel, Vollkorn-Cerealien Dunkle Schokolade, Kakaopulver Gummibonbon mit Frucht
Gemüse Blau-violette Kartoffeln, Möhren, Tomaten, rote und orange Paprika, Rotkohl, rote Beete, Radicchio, Radieschen, Rhabarber, rote und schwarze Hülsenfrüchte (Kidney-Bohnen, rote Linsen, ...), Aubergine, Kürbis, rote Zwiebeln	Sonstiges Tomatensoße, -püree, -mark Ketchup Rotes Pesto Sojaprodukte	Anthocyane sind als Lebensmittelzusatzstoff unter der Nummer E 163 zugelassen → Zutatenliste beachten!

Hinweis zu Getränken:

Bitte verzichten Sie auf:

- Rotwein
- Obstsäfte, -schorlen
- Smoothies
- Gemüsesäfte

- !** Diese Liste erhebt nicht den Anspruch auf Vollständigkeit.
 Bitte achten Sie deshalb auch selbst beim Einkauf und Verzehr von Lebensmitteln darauf, ob nicht eventuell anthocyanreiches Obst oder Gemüse enthalten sind.

Verzichten Sie unbedingt auch auf Nahrungsergänzungsmittel (Multivitaminbrausen, Vitaminpräparate, usw.)!



ANTHONIA-Studie

Wirkung von Anthocyanen auf die Darmflora

Allgemeine Hinweise:

- Bitte beachten Sie unbedingt die „**Verbotsliste**“!
- Alle **Einschränkungen** gelten für die gesamte Studiendauer (genaue Zeiten siehe individueller Ablaufplan)
Kurse A und B – 19. April bis 07. Juli mit Unterbrechungen lt. Zeitplan.
Kurs C – Drei Phasen á 10 Tage lt. Zeitplan.
- Achten Sie auf die **eingeschränkte Getränkeauswahl**!
- Das **Gelingen der Studie** hängt entscheidend davon ab, ob Sie sich an diese **Lebensmittelbeschränkungen halten**!

Vielen Dank für Ihre Mitarbeit!

Projektleiter:

Prof. Dr. Clemens Kunz
Institut für Ernährungswissenschaft
Wilhelmstraße 20
35392 Gießen
Tel. 0641 – 99 39041

Ansprechpartnerin/Studienassistentin:

Frau Sinaida Streichert
sinaida.streichert@innere.med.uni-giessen.de

Tel. 0177 – 63 34 285

A-3 Ablauf eines Messtages und Ernährungsprotokoll der Humanstudie I

Proband:
Dienstag 27.04.2010

Datum: 22.04.-28.04.2010

Aufgaben:

- **Lebensmittelauswahl (inkl. Getränke) beachten**
- **Ernährungsprotokoll führen**
- **1 Stuhlprobe in jeweils 1 Röhrchen innerhalb dieses Tages entnehmen,**
- **Stuhlprobe entfällt, wenn am Vortag schon eine Stuhlprobe entnommen wurde!**

Uhrzeit	Ereignis	Durchführung
00.00 – 24.00	Stuhl	Stuhl: Nach Stuhlgang jeweils mit dem Löffelchen ein möglichst „großes“ Volumen Stuhl entnehmen, in das Röhrchen mit der Beschriftung „A10 1 1. Probe“ füllen, fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren, anschließend sofort einfrieren. Diesen Vorgang für beide Stuhlröhrchen („normal“, „mit Puffer“) durchführen.

Dienstag 27.04.2010

Zeit	Lebensmittel	Aktivität
7.00		
8.00		
9.00		
10.00		
11.00		
12.00		
13.00		
14.00		
15.00		
16.00		
17.00		
18.00		
19.00		
20.00		
21.00		
22.00		
23.00		
Nachts		

Morgen 6.00 Uhr beginnt Versuchstag 1, Wecker stellen!!!

Proband:

Datum: 22.04.-28.04.2010

Mittwoch 28.04.2010 – Versuchstag 1 Seite 1

Aufgaben:

- **Lebensmittelauswahl (inkl. Getränke) beachten**
- **Ernährungsprotokoll führen**
- **Probennahme:**
 - Atemproben** werden stündlich auf die gleiche Weise genommen, nur die Beschriftung (Uhrzeit) der Röhrchen ändert sich
 - Der gesamt anfallende Urin** zu den entsprechenden Fraktionen wird im großen Urinbehälter (1,5 l) gesammelt, am Ende der Fraktion ein Aliquot in ein kleines Urindöschen gefüllt und dieses sofort eingefroren. Das Volumen der gesamten Urinfraktion wird mit dem Messzylinder bestimmt.
 - Stuhlproben vor der Aufnahme** des Lactoseureid werden in den Röhrchen mit der Beschriftung „**1. Probe**“ entnommen
 - Stuhlproben nach der Aufnahme** des Lactoseureid werden in den Röhrchen mit der Beschriftung „**2. Probe**“ entnommen
- **Atem-, Urin-, und Stuhlproben bei Studienaufsicht abgeben**
- **Urin- und Stuhlproben bei eigener Lagerung im Gefrierfach aufbewahren**

Proband:
Mittwoch 28.04.2010 – Versuchstag 1 Seite 2

Datum: 22.04.-28.04.2010

Uhrzeit	Ereignis	Durchführung
00.00 – 24.00	Stuhl	Stuhl: Nach Stuhlgang jeweils mit dem Löffelchen ein möglichst „großes“ Volumen Stuhl entnehmen, in das Röhrchen mit der Beschriftung „A10 1 1. Probe“ füllen, fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren, anschließend sofort einfrieren. Diesen Vorgang für beide Stuhlröhrchen („normal“, „mit Puffer“) durchführen.

Uhrzeit	Ereignis	Durchführung	Urinvolumen (ml)
5.55	Atem	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren	
	Urin	Urin: komplette Blasenentleerung, Urin in großem Urinbehälter (1,5 l) sammeln. Davon ca. 20ml in Urindöschen mit der Beschriftung „A101 6“ füllen (ca. zu $\frac{3}{4}$ füllen, nicht komplett!) und dieses sofort einfrieren.	
6.00	Bolus gabe Lactoseurid	100ml Probenlösung trinken. (braunes 100ml Fläschchen)	
7.00	Atem	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren	
8.00	Atem	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren	
9.00	Atem	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren	
	Urin	Urin: komplette Blasenentleerung, Urin in großem Urinbehälter (1,5 l) sammeln. Davon ca. 20ml in Urindöschen mit der Beschriftung „A101 9“ füllen (ca. zu $\frac{3}{4}$ füllen, nicht komplett!) und dieses sofort einfrieren. Volumen der gesamten Urinfraktion mit Messzylinder bestimmen und notieren (gelbes Kästchen rechts)	

Proband:**Datum: 22.04.-28.04.2010****Mittwoch 28.04.2010 – Versuchstag 1 Seite 3**

Uhrzeit	Ereignis	Durchführung	Urinvolumen (ml)
10.00	Atem	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren	
11.00	Atem	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren	
12.00	Atem Urin	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren Urin: komplette Blasenentleerung, Urin in großem Urinbehälter (1,5 l) sammeln. Davon ca. 20ml in Urindöschen mit der Beschriftung „ A101 12 “ füllen (ca. zu $\frac{3}{4}$ füllen, nicht komplett!) und dieses sofort einfrieren. Volumen der gesamten Urinfraktion mit Messzylinder bestimmen und notieren (gelbes Kästchen rechts)	
13.00	Atem	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren	
14.00	Atem	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren	
15.00	Atem Urin	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren Urin: komplette Blasenentleerung, Urin in großem Urinbehälter (1,5 l) sammeln. Davon ca. 20ml in Urindöschen mit der Beschriftung „ A101 15 “ füllen (ca. zu $\frac{3}{4}$ füllen, nicht komplett!) und dieses sofort einfrieren. Volumen der gesamten Urinfraktion mit Messzylinder bestimmen und notieren (gelbes Kästchen rechts)	
16.00	Atem	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren	
17.00	Atem	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren	

Proband:
Mittwoch 28.04.2010 – Versuchstag 1 Seite 4

Datum: 22.04.-28.04.2010

Uhrzeit	Ereignis	Durchführung	Urinvolumen (ml)
18.00	Atem Urin	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren Urin: komplette Blasenentleerung, Urin in großem Urinbehälter (1,5 l) sammeln. Davon ca. 20ml in Urindöschen mit der Beschriftung „ A101 18 “ füllen (ca. zu $\frac{3}{4}$ füllen, nicht komplett!) und dieses sofort einfrieren. Volumen der gesamten Urinfraktion mit Messzylinder bestimmen und notieren (gelbes Kästchen rechts)	
19.00	Atem	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren	
20.00	Atem	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren	
21.00	Atem Urin	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren Urin: komplette Blasenentleerung, Urin in großem Urinbehälter (1,5 l) sammeln. Davon ca. 20ml in Urindöschen mit der Beschriftung „ A101 21 “ füllen (ca. zu $\frac{3}{4}$ füllen, nicht komplett!) und dieses sofort einfrieren. Volumen der gesamten Urinfraktion mit Messzylinder bestimmen und notieren (gelbes Kästchen rechts)	
22.00	Atem	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren	
23.00	Atem	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren	
24.00	Atem Urin	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren Urin: komplette Blasenentleerung, Urin in großem Urinbehälter (1,5 l) sammeln. Davon ca. 20ml in Urindöschen mit der Beschriftung „ A101 24 “ füllen (ca. zu $\frac{3}{4}$ füllen, nicht komplett!) und dieses sofort einfrieren. Volumen der gesamten Urinfraktion mit Messzylinder bestimmen und notieren (gelbes Kästchen rechts)	

Versuchstag endet noch nicht hier – letzte Probe am Donnerstag
Urin zwischen 24.00 Uhr (Mittwoch) und 6.00 Uhr (Donnerstag) muss gesammelt werden!

Mittwoch 28.04.2010

Zeit	Lebensmittel	Aktivität
7.00		
8.00		
9.00		
10.00		
11.00		
12.00		
13.00		
14.00		
15.00		
16.00		
17.00		
18.00		
19.00		
20.00		
21.00		
22.00		
23.00		
Nachts		

Proband:**Datum: 22.04.-28.04.2010****Donnerstag 29.04.2010 – Ende Versuchstag 1****Aufgaben:**

- **Lebensmittelauswahl (inkl. Getränke) beachten**
- **Ernährungsprotokoll führen**
- **Probennahme: letzte Atem- und Urinprobe um 6.00 Uhr**
- **Atemproben** werden stündlich auf die gleiche Weise genommen, nur die Beschriftung (Uhrzeit) der Röhrchen ändert sich

Der gesamt anfallende Urin zu den entsprechenden Fraktionen wird im großen Urinbehälter (1,5 l) gesammelt, am Ende der Fraktion ein Aliquot in ein kleines Urindöschen gefüllt und dieses sofort eingefroren. Das Volumen der gesamten Urinfraktion wird mit dem Messzylinder bestimmt.

Stuhlproben vor der Aufnahme des Lactoseureid werden in den Röhrchen mit der Beschriftung „**1. Probe**“ entnommen

Stuhlproben nach der Aufnahme des Lactoseureid werden in den Röhrchen mit der Beschriftung „**2. Probe**“ entnommen

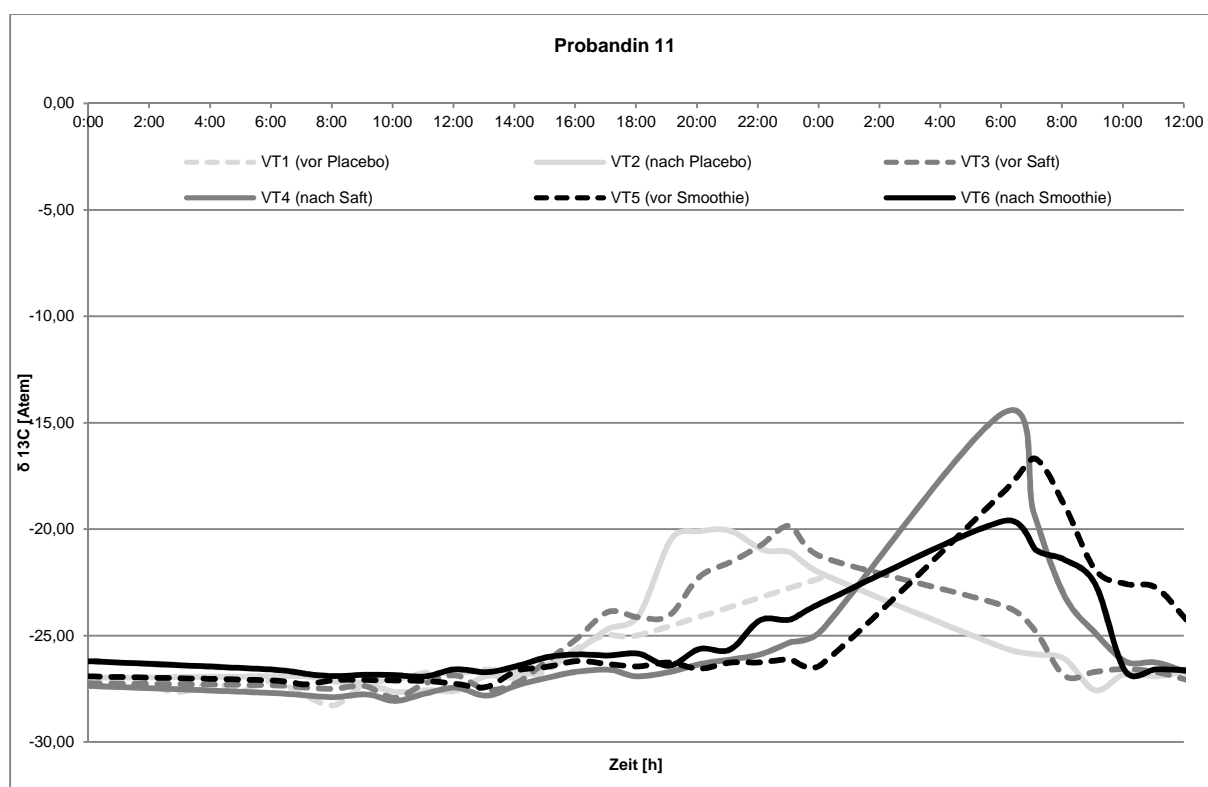
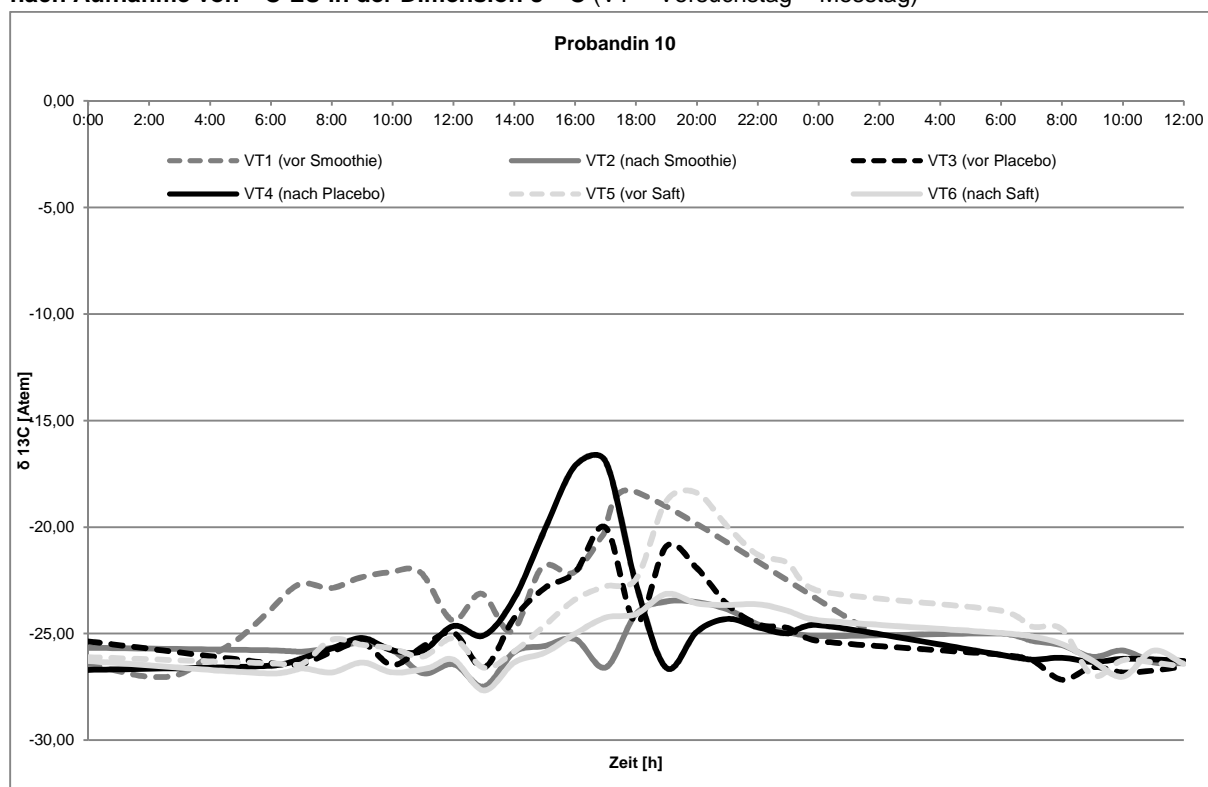
- **Atem-, Urin-, und Stuhlproben bei Studienaufsicht abgeben**
- **Urin- und Stuhlproben bei eigener Lagerung im Gefrierfach aufbewahren**

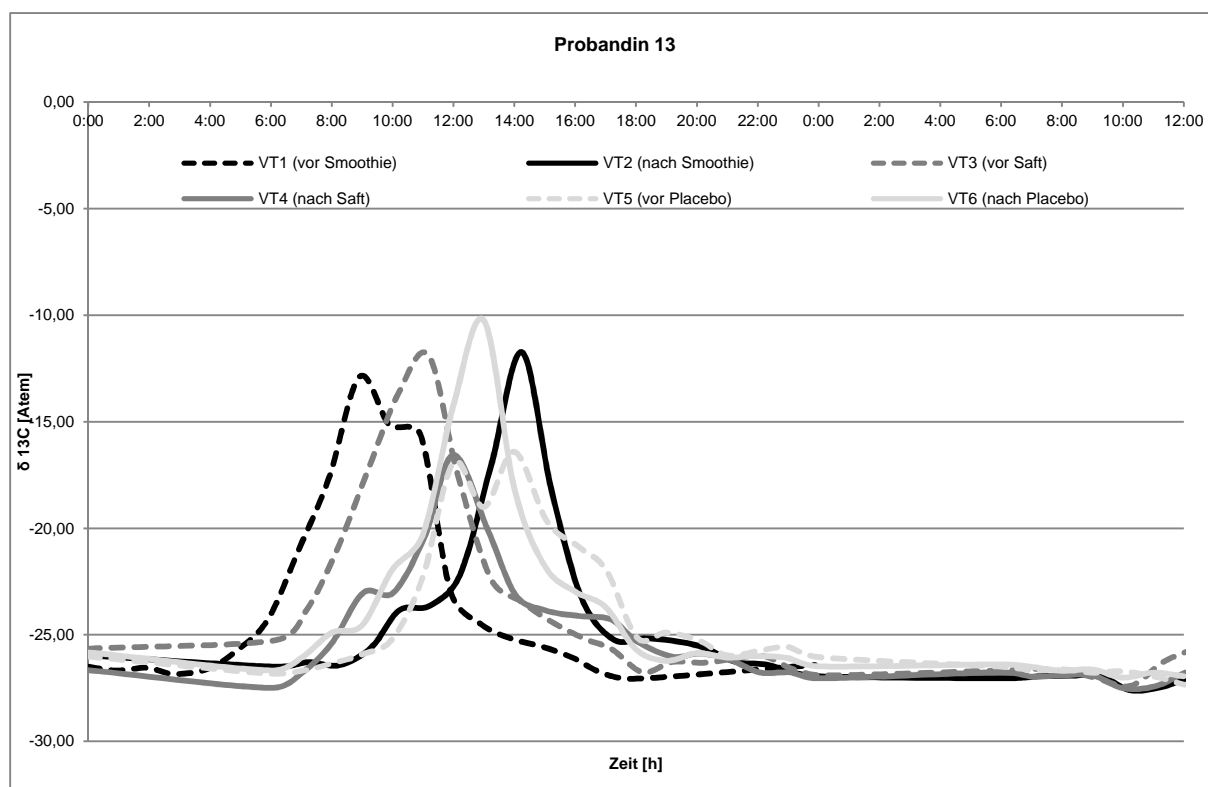
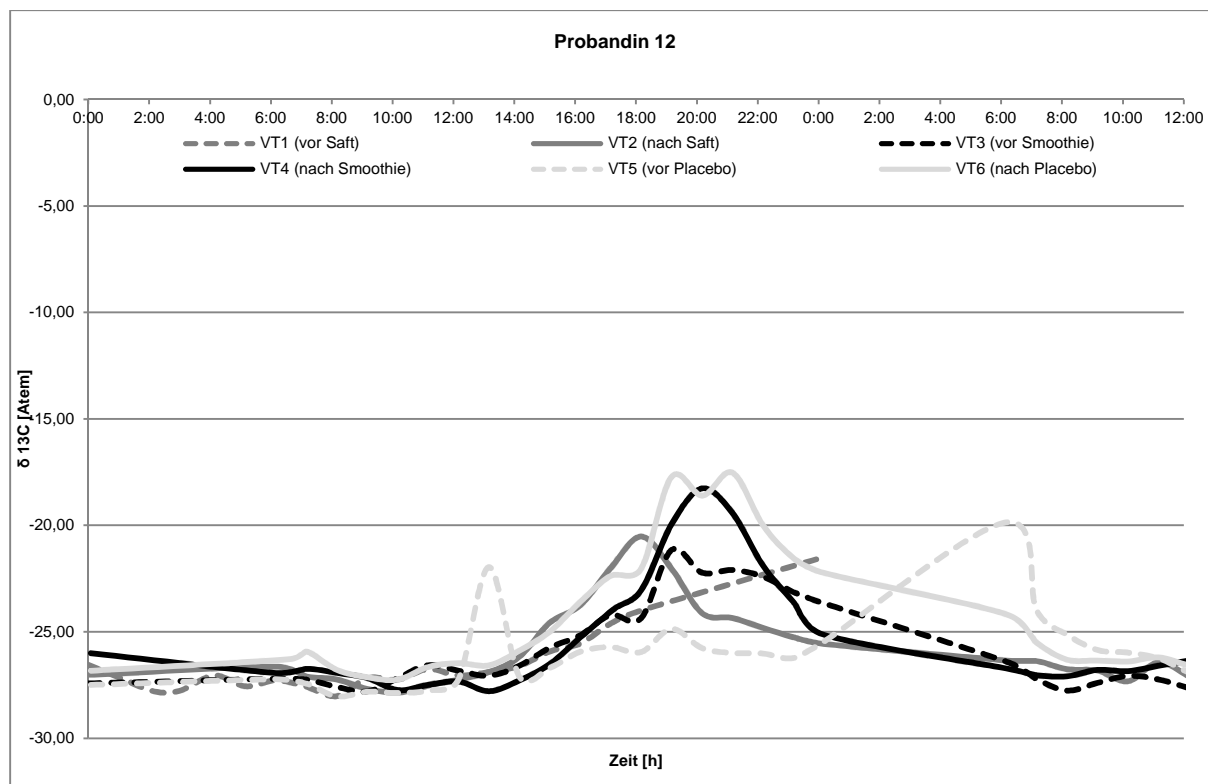
Uhrzeit	Ereignis	Durchführung
00.00 – 24.00	Stuhl	Stuhl: Nach Stuhlgang jeweils mit dem Löffelchen ein möglichst „großes“ Volumen Stuhl entnehmen, in das Röhrchen mit der Beschriftung „A10 1 1. Probe“ füllen, fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren, anschließend sofort einfrieren. Diesen Vorgang für beide Stuhlröhrchen („normal“, „mit Puffer“) durchführen.

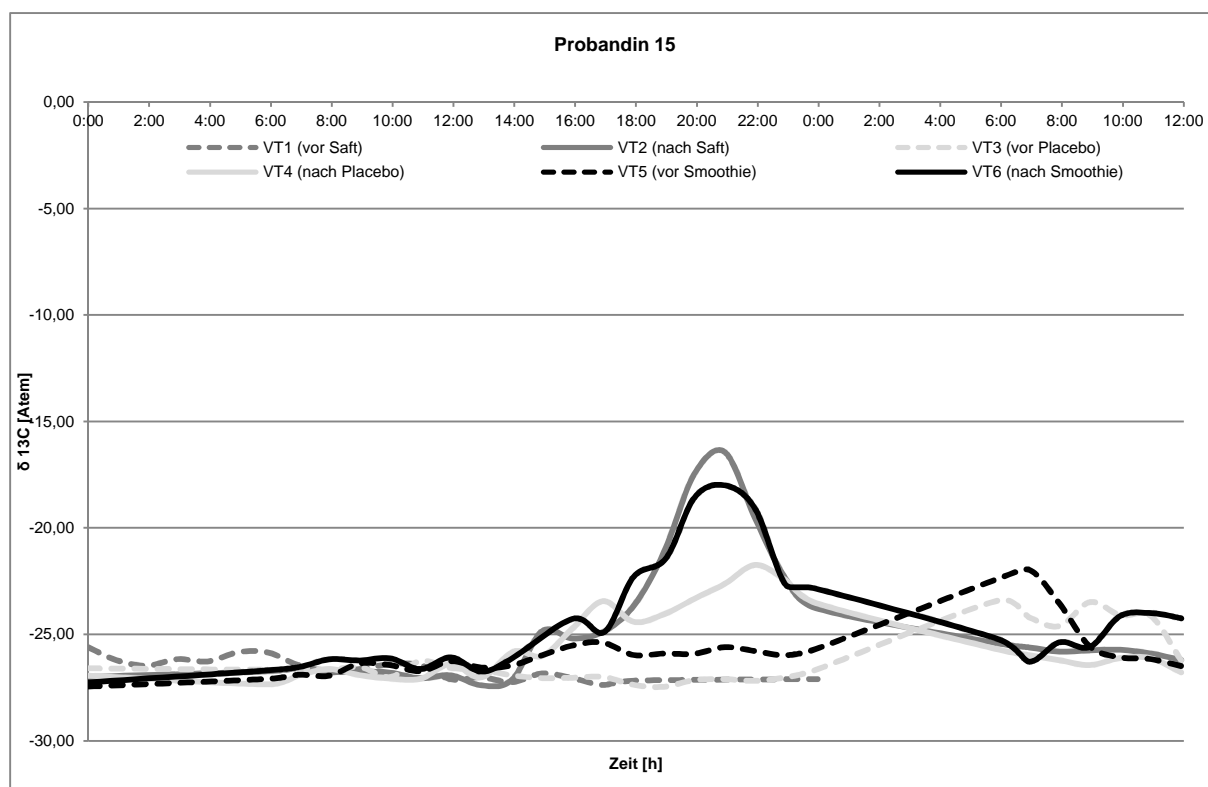
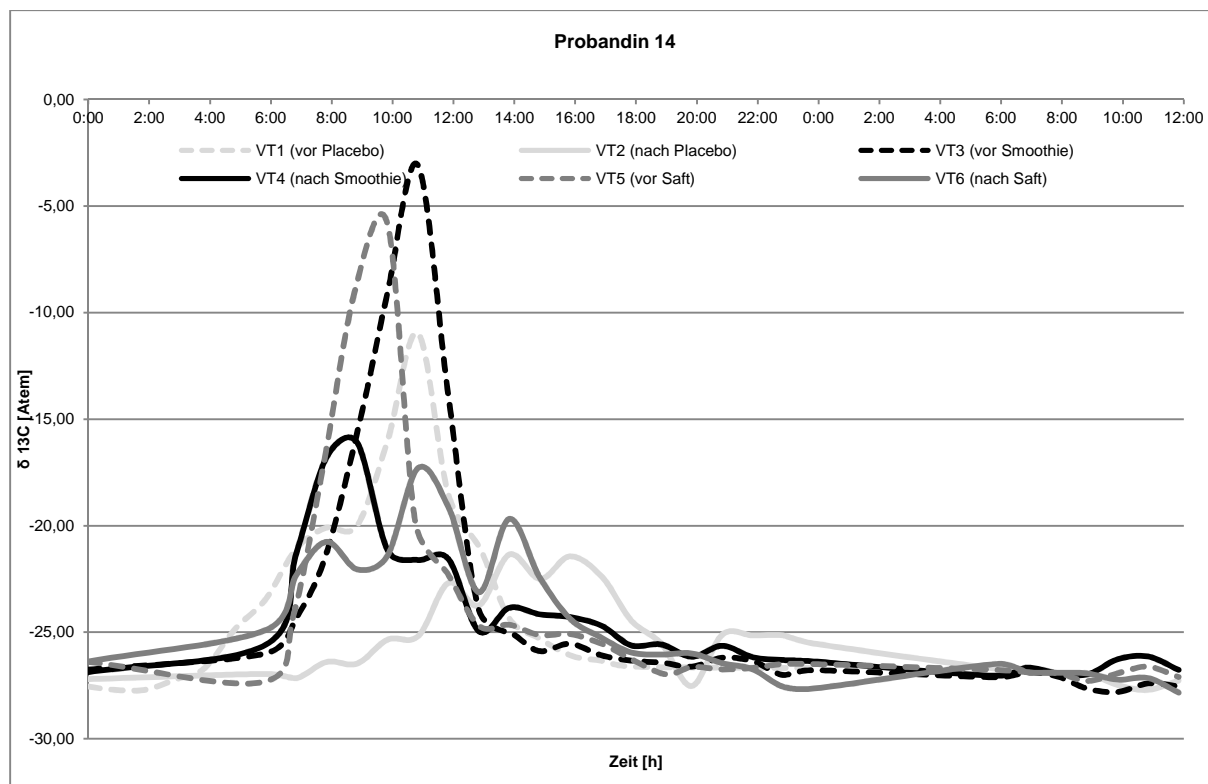
Uhrzeit	Ereignis	Durchführung	Urinvolumen (ml)
6.00	Atem	Atem: durch Strohhalm ins Röhrchen pusten, Röhrchen mit Gummistopfen fest verschließen und Uhrzeit darauf notieren	
	Urin	Urin: komplette Blasenentleerung, Urin in großem Urinbehälter (1,5 l) sammeln. Davon ca. 20ml in Urindöschen mit der Beschriftung „ A101 Do6 “ füllen (ca. zu $\frac{3}{4}$ füllen, nicht komplett!) und dieses sofort einfrieren. Volumen der gesamten Urinfraktion mit Messzylinder bestimmen und notieren (gelbes Kästchen rechts)	

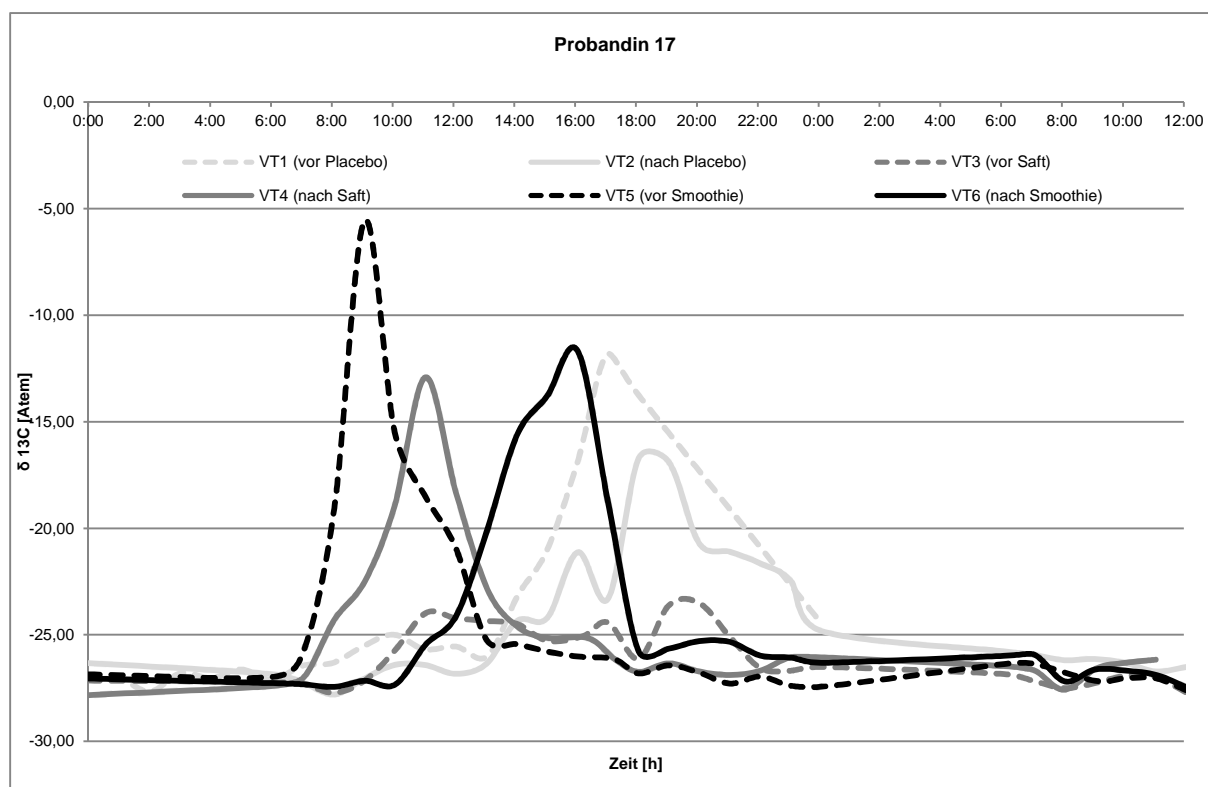
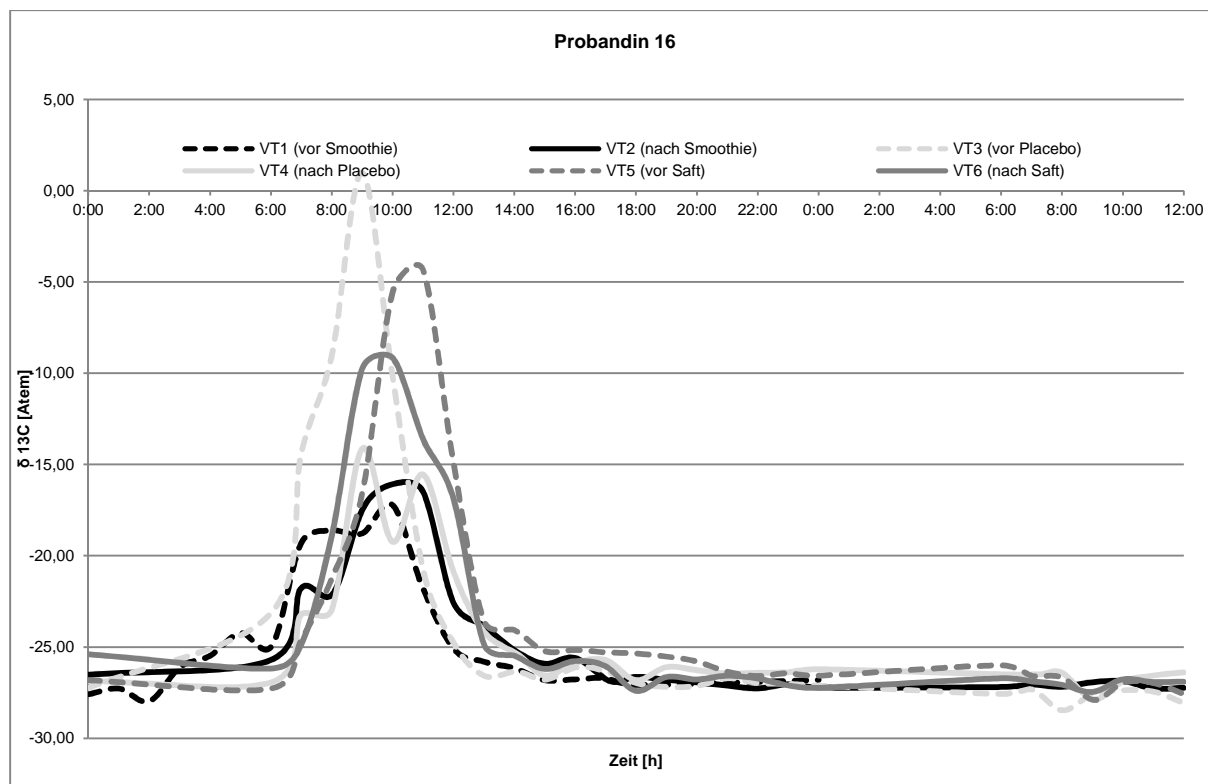
- **Nach letzter Atem- und Urinprobe, beginnt tägliche Aufnahme des Testgetränks**
- **1 Flasche Testgetränk zum Frühstück aufnehmen**

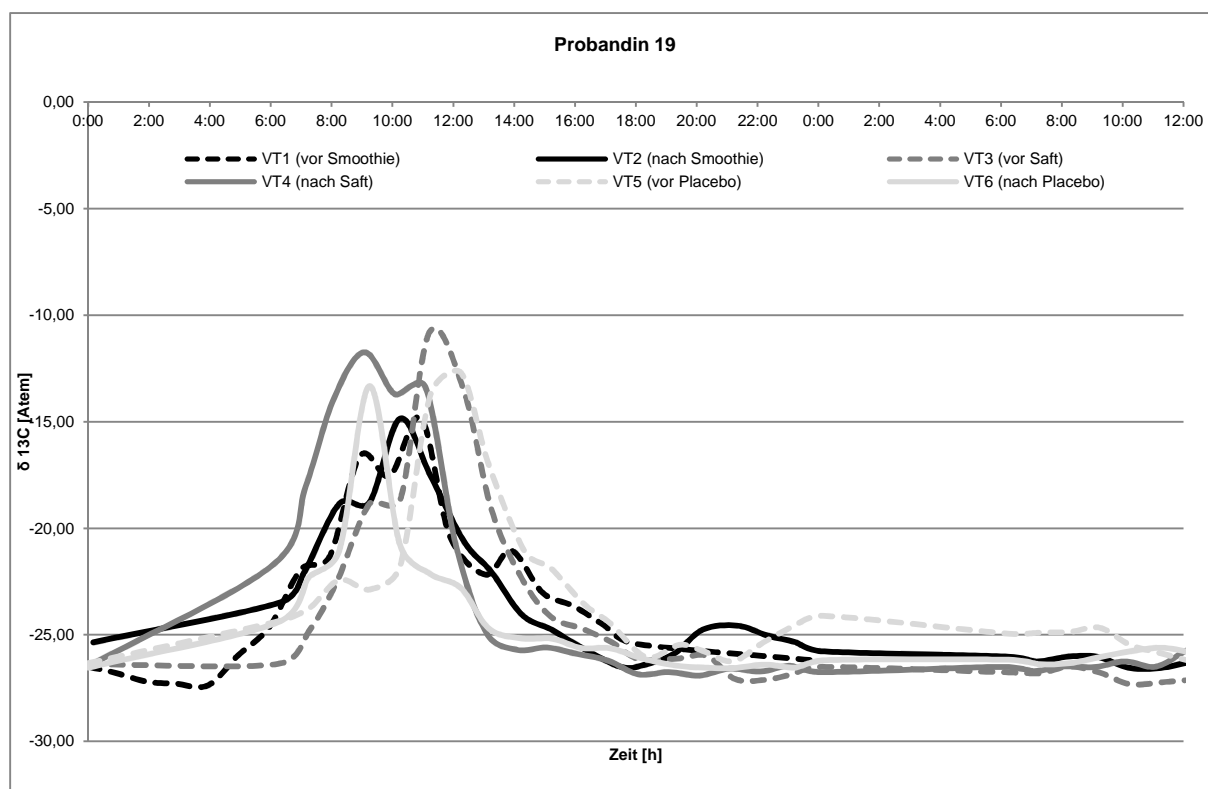
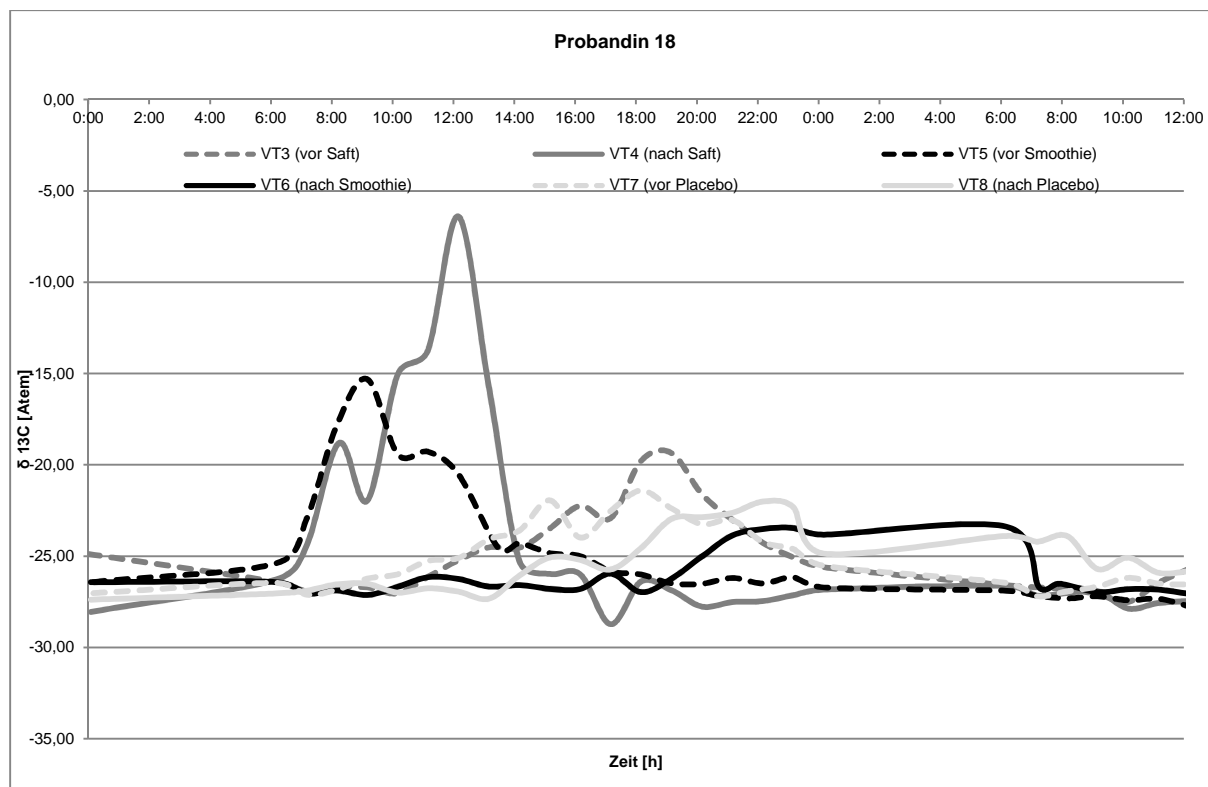
A-4 Individuelle $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgaszeitprofile der Probandinnen aus Humanstudie I an den Versuchstagen nach Aufnahme von ^{13}C -LU in der Dimension $\delta^{13}\text{C}$ (VT = Versuchstag = Messtag)

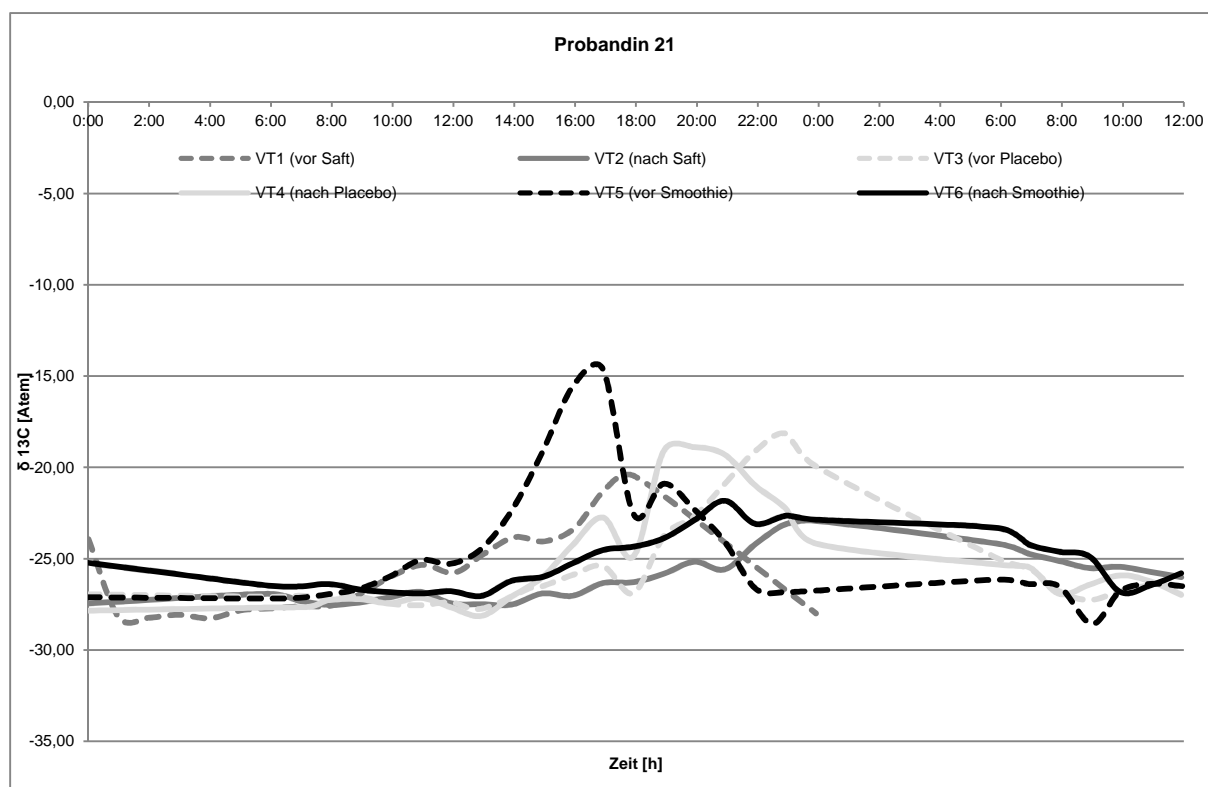
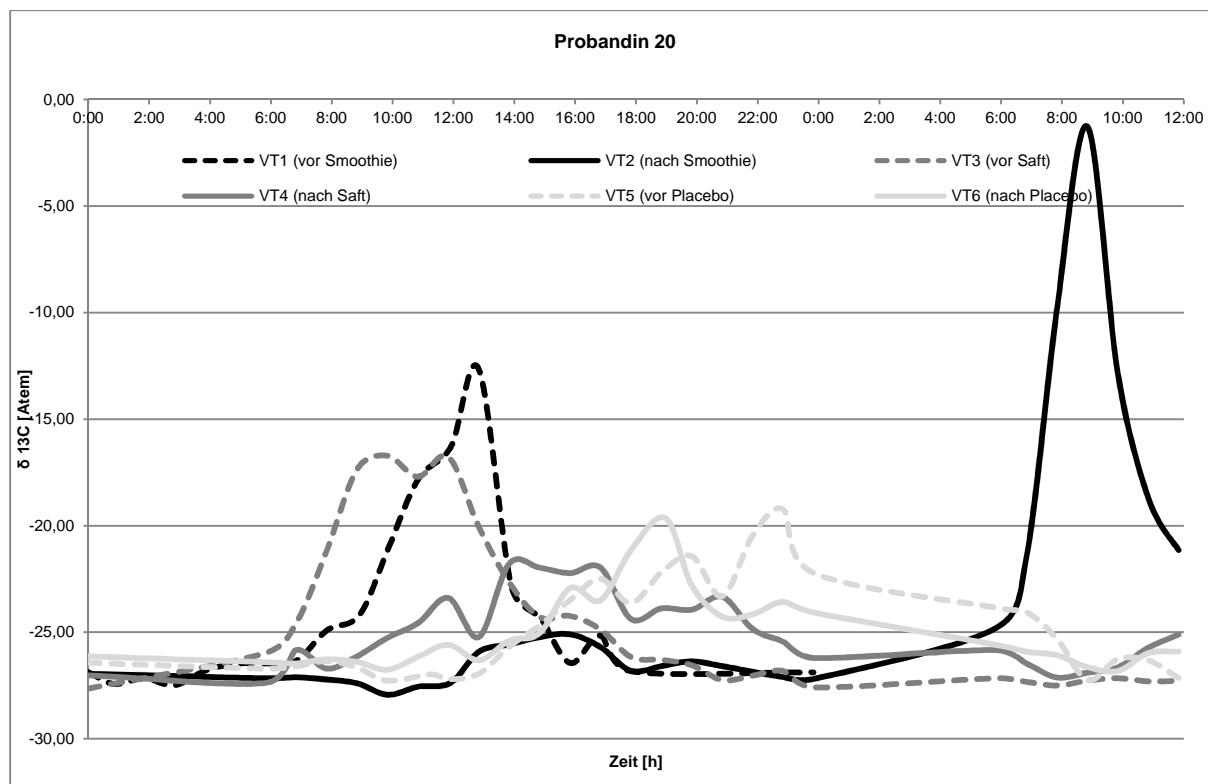


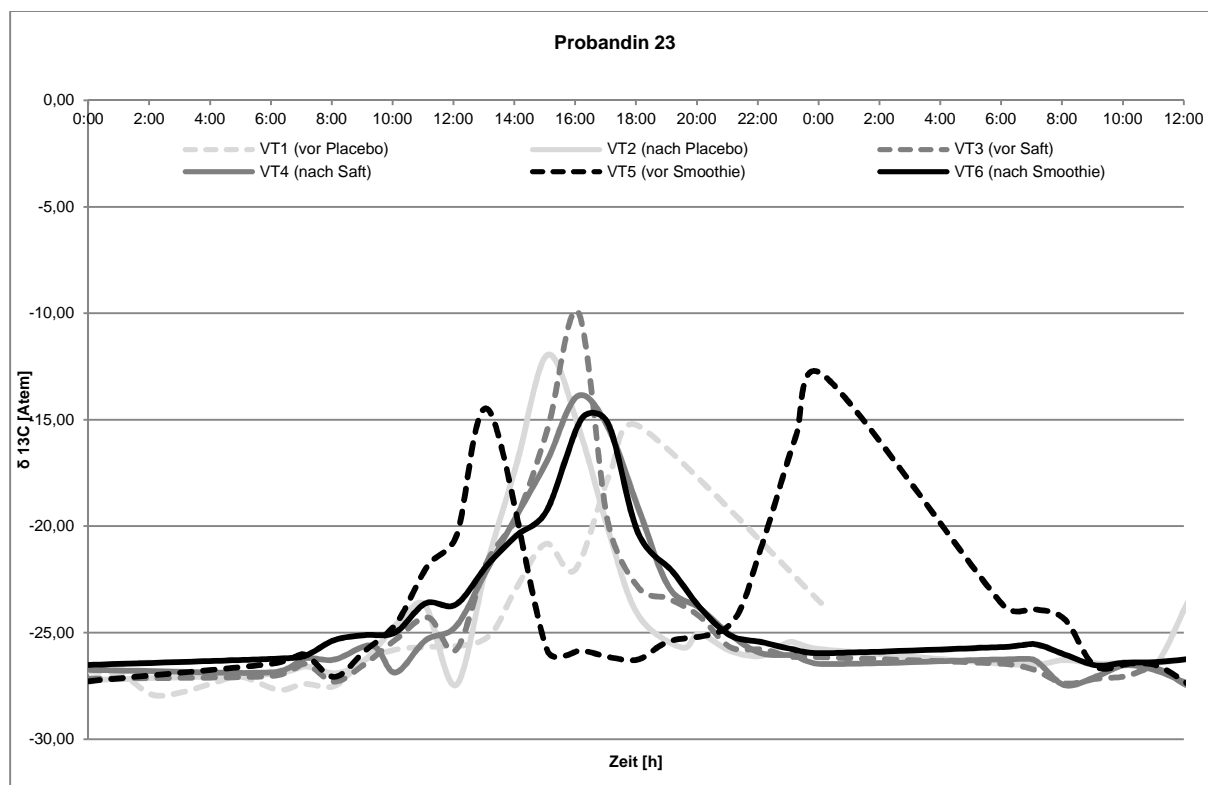
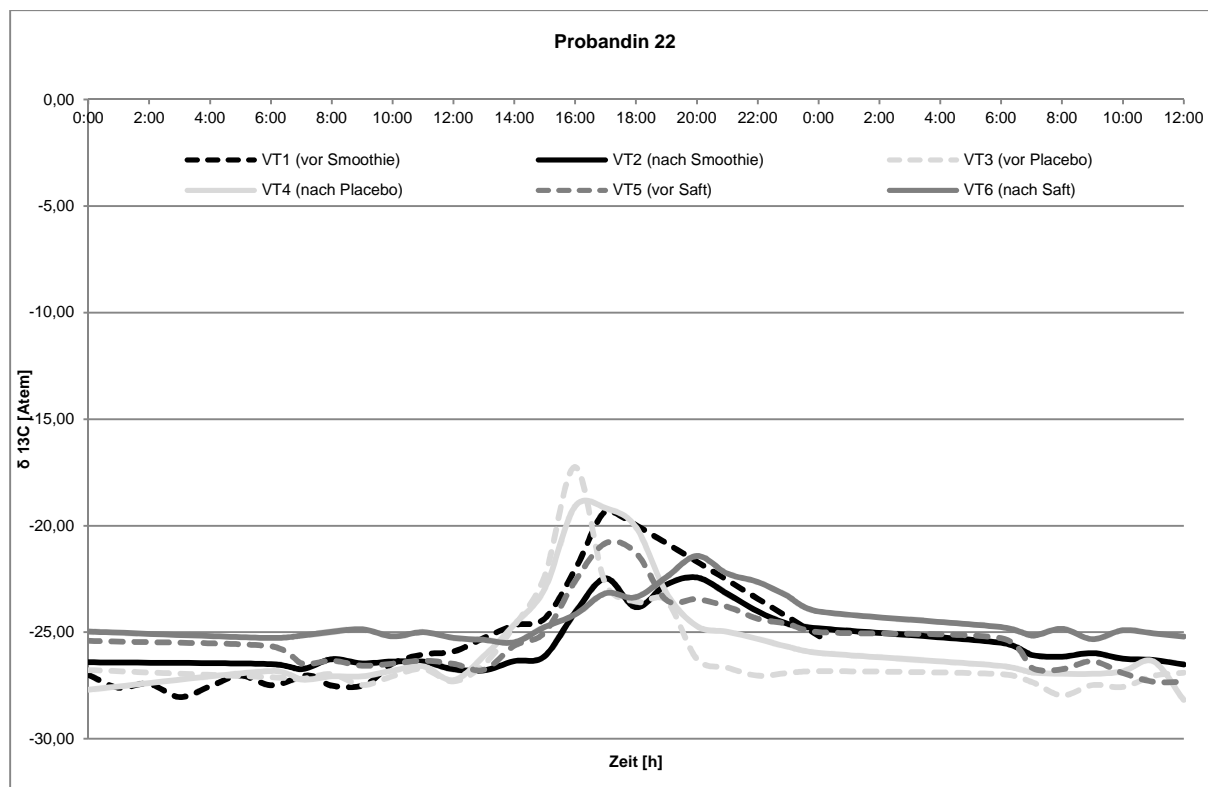


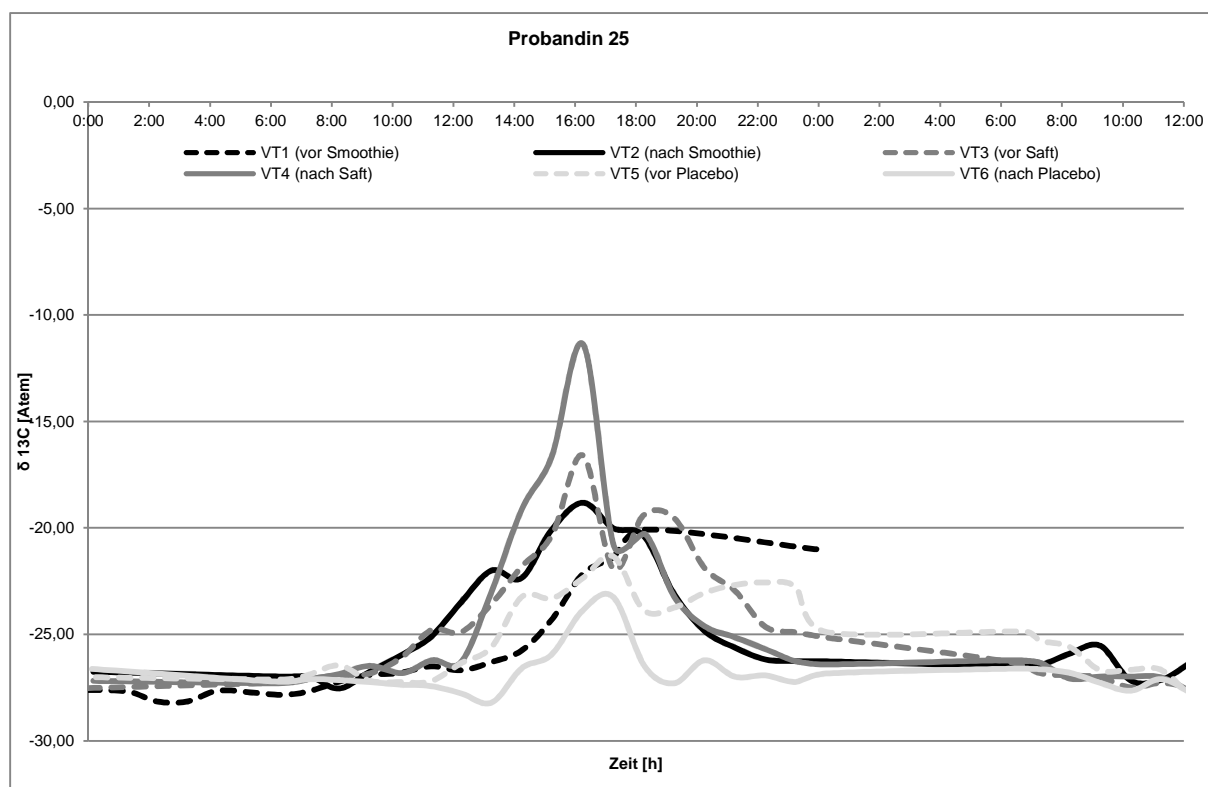
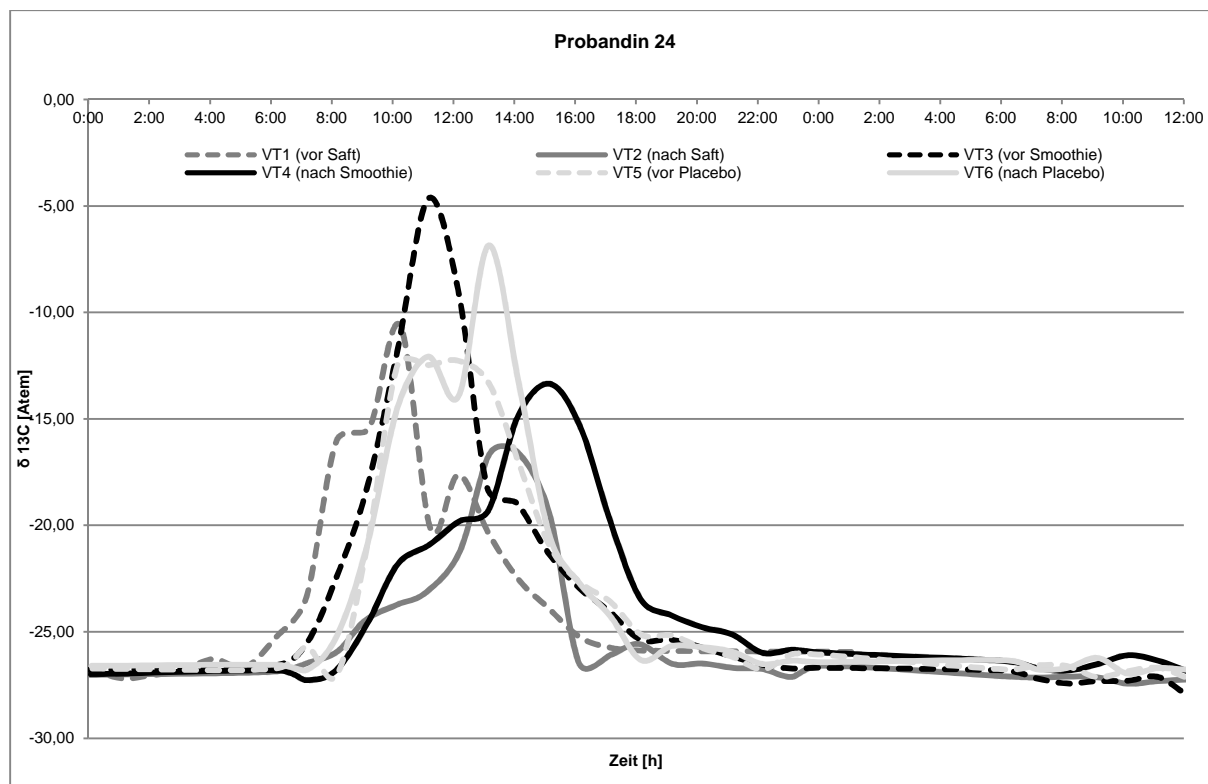


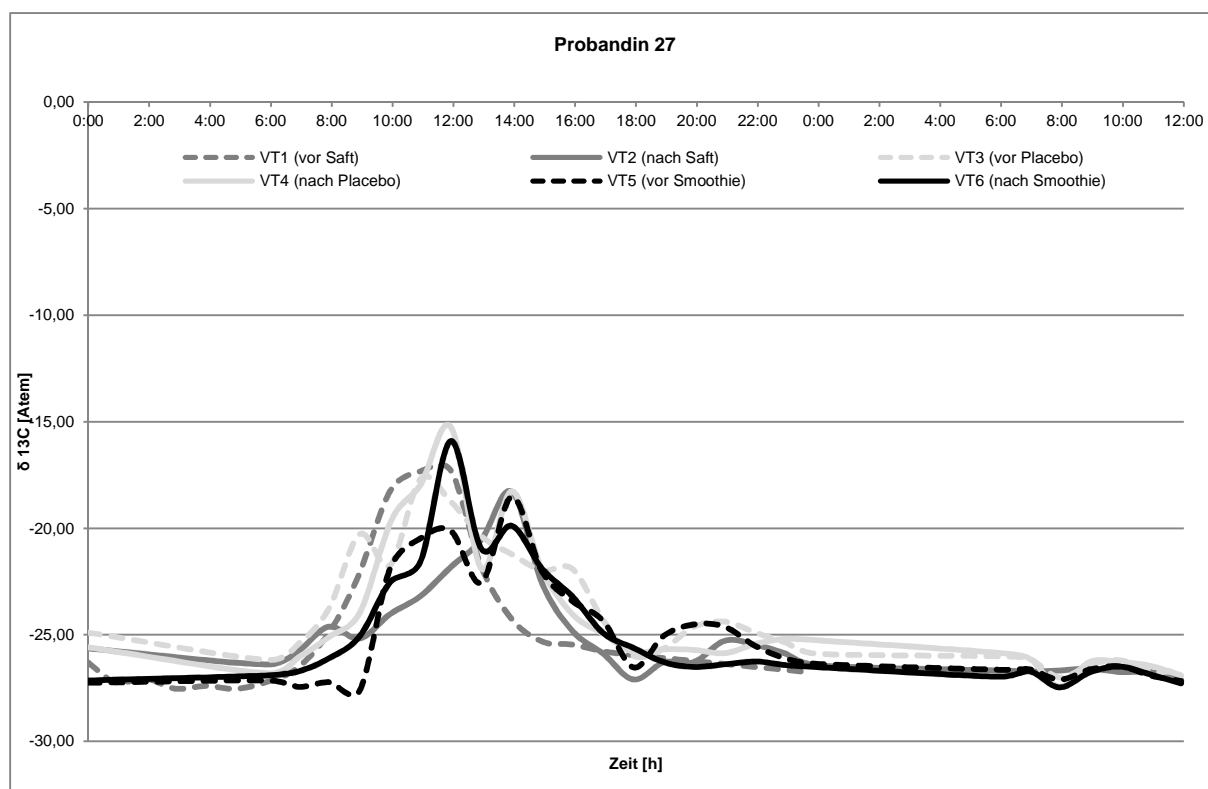
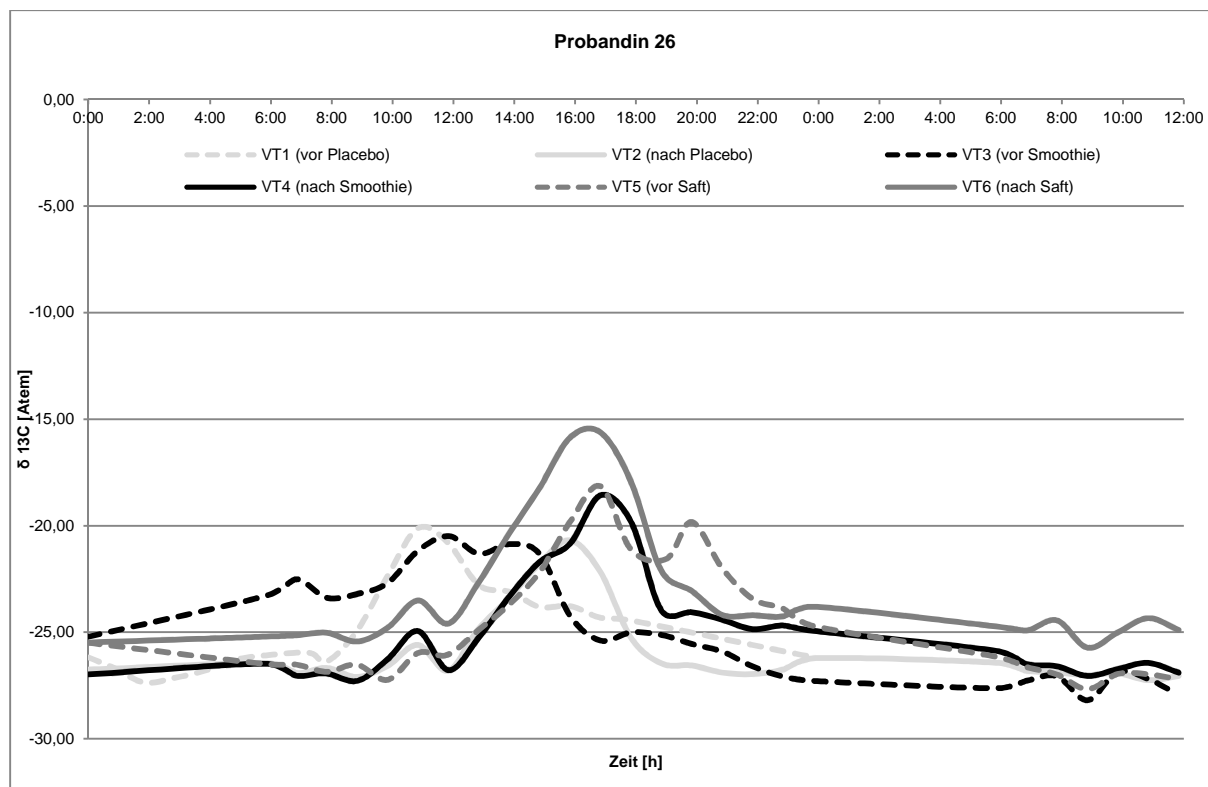


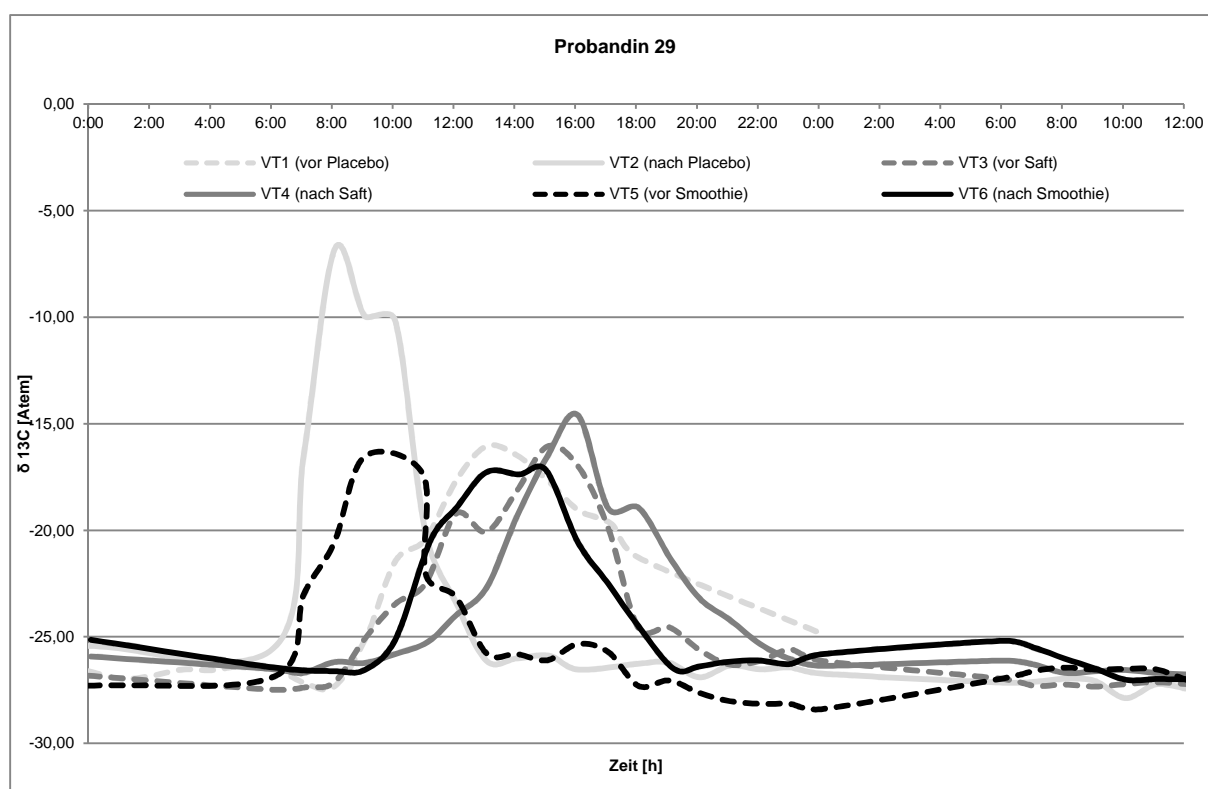
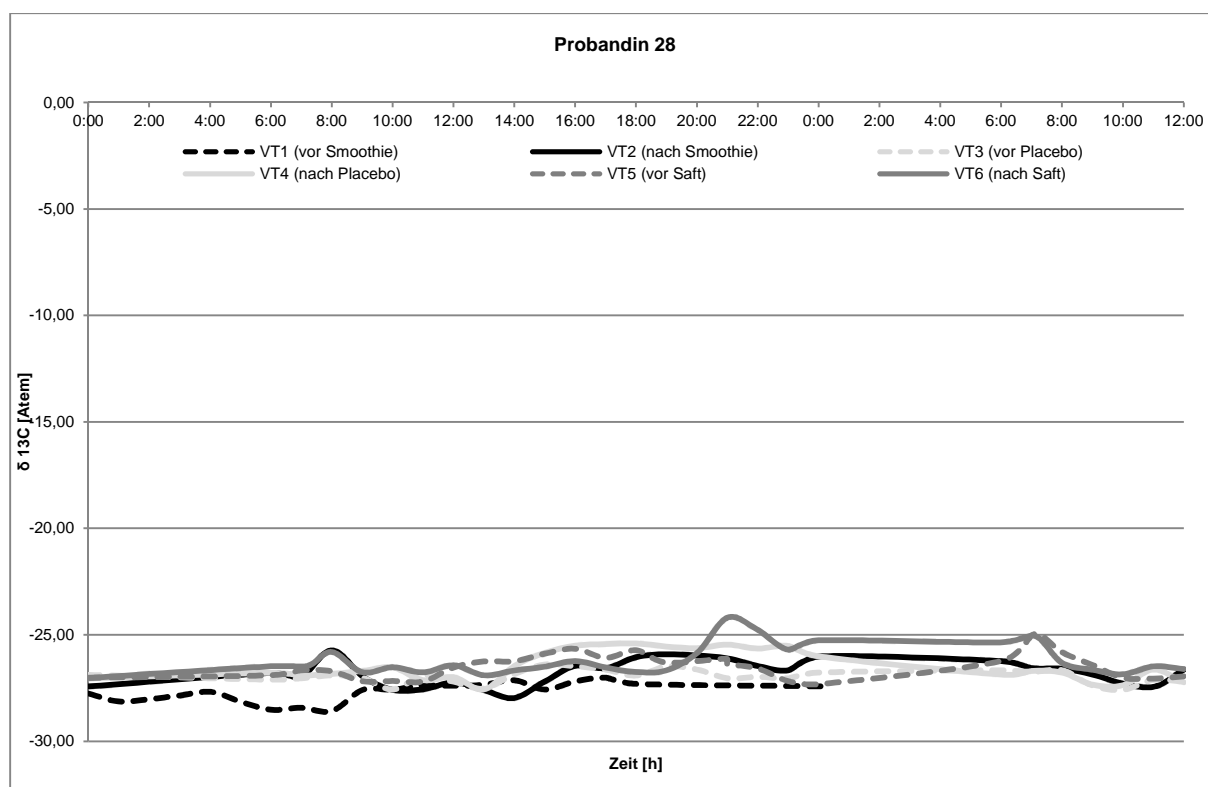


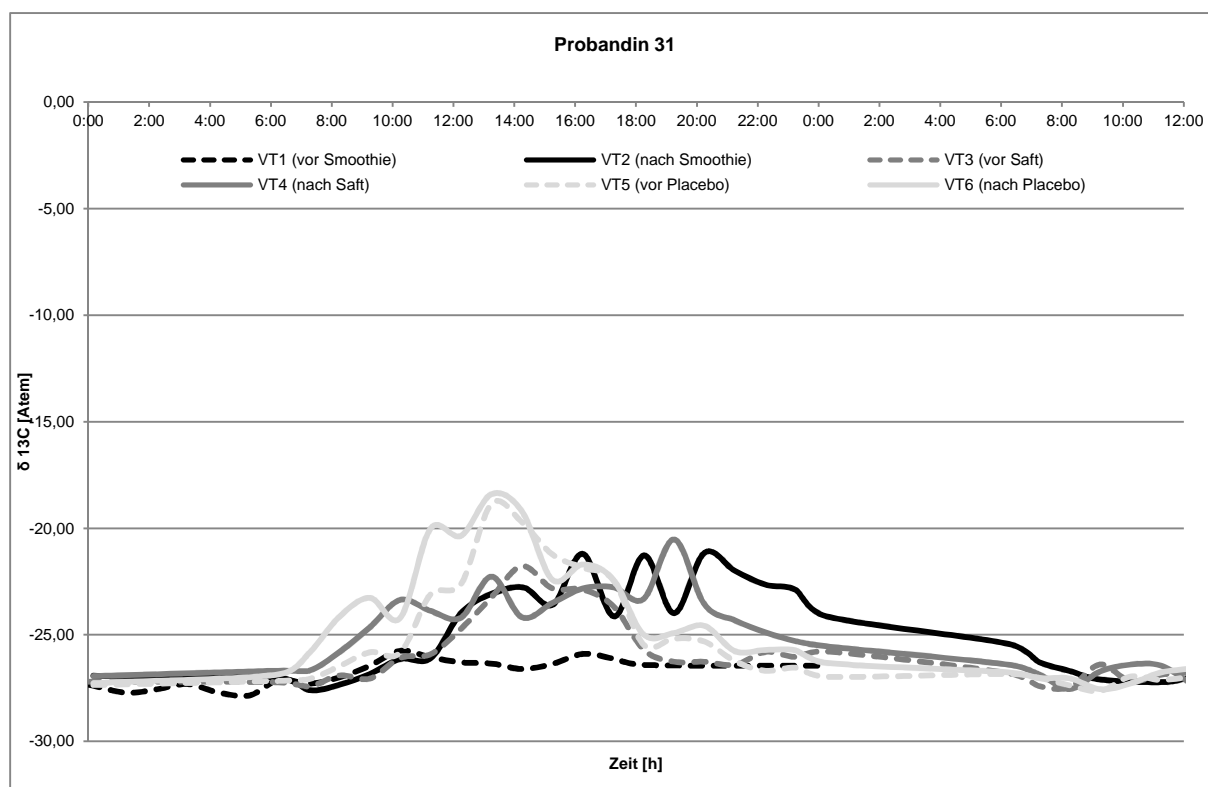
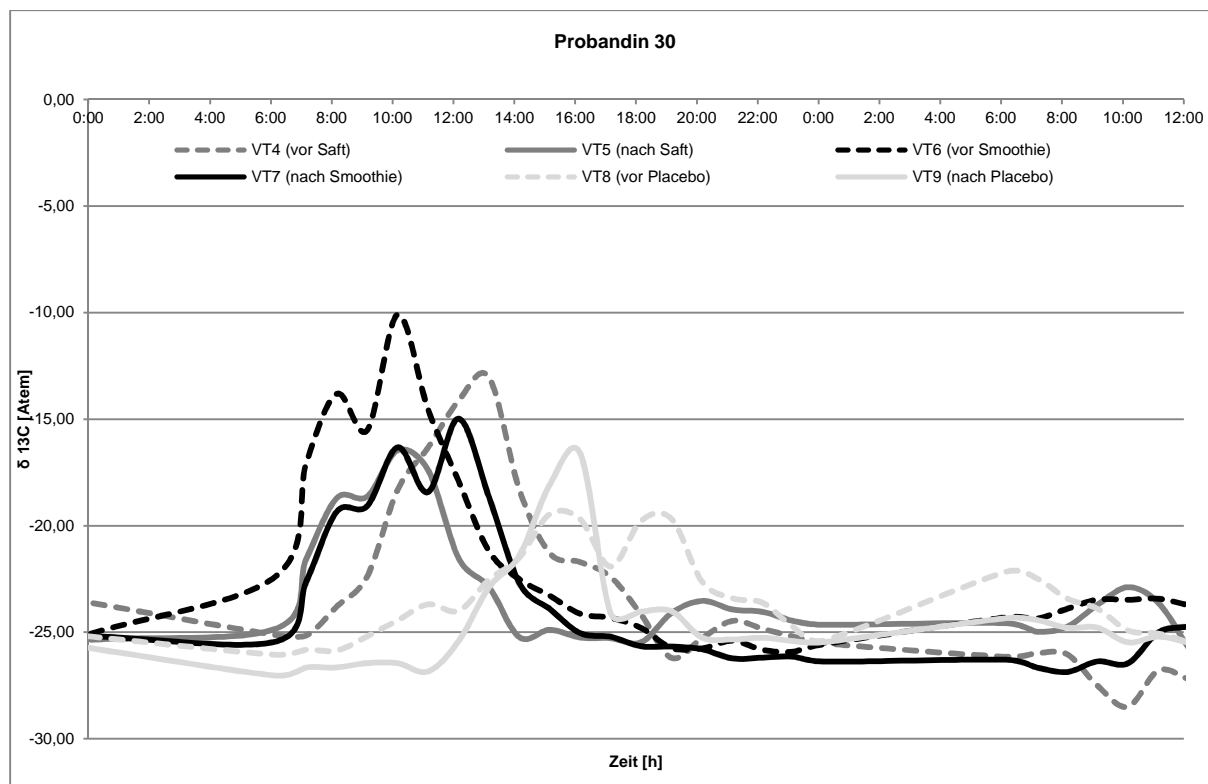


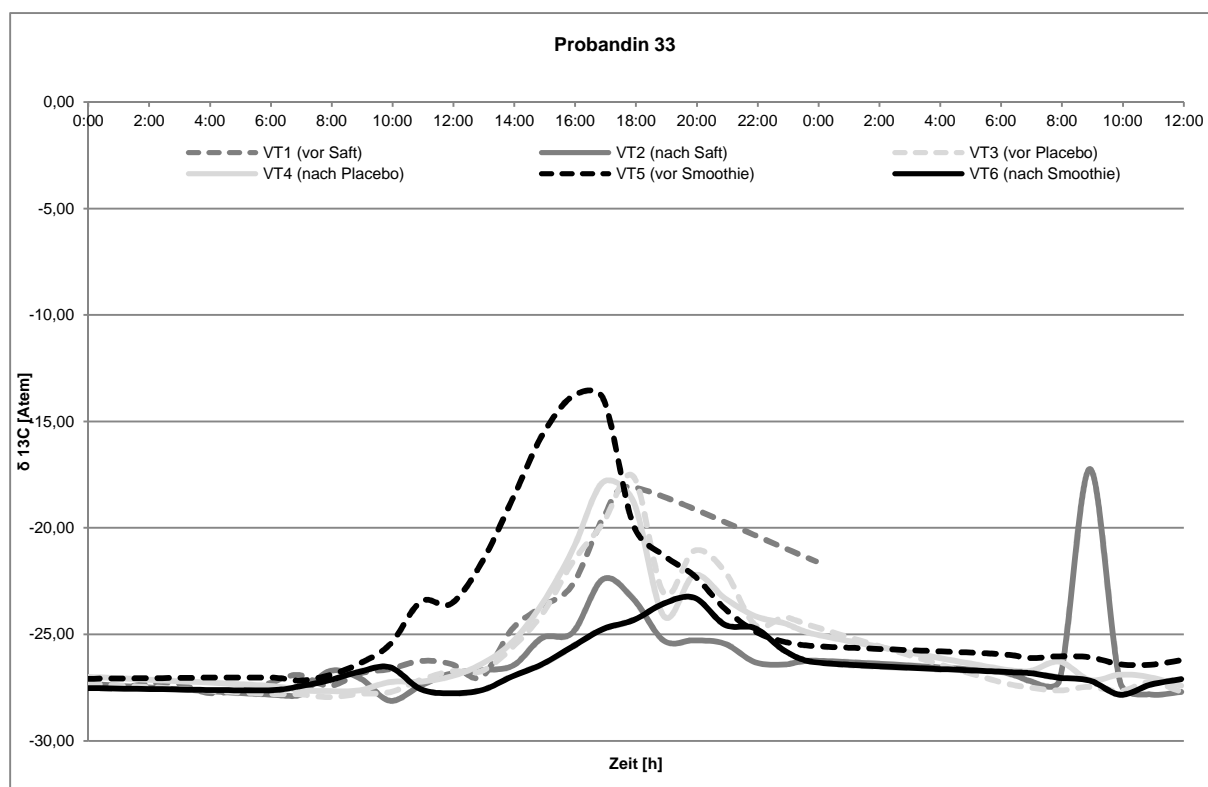
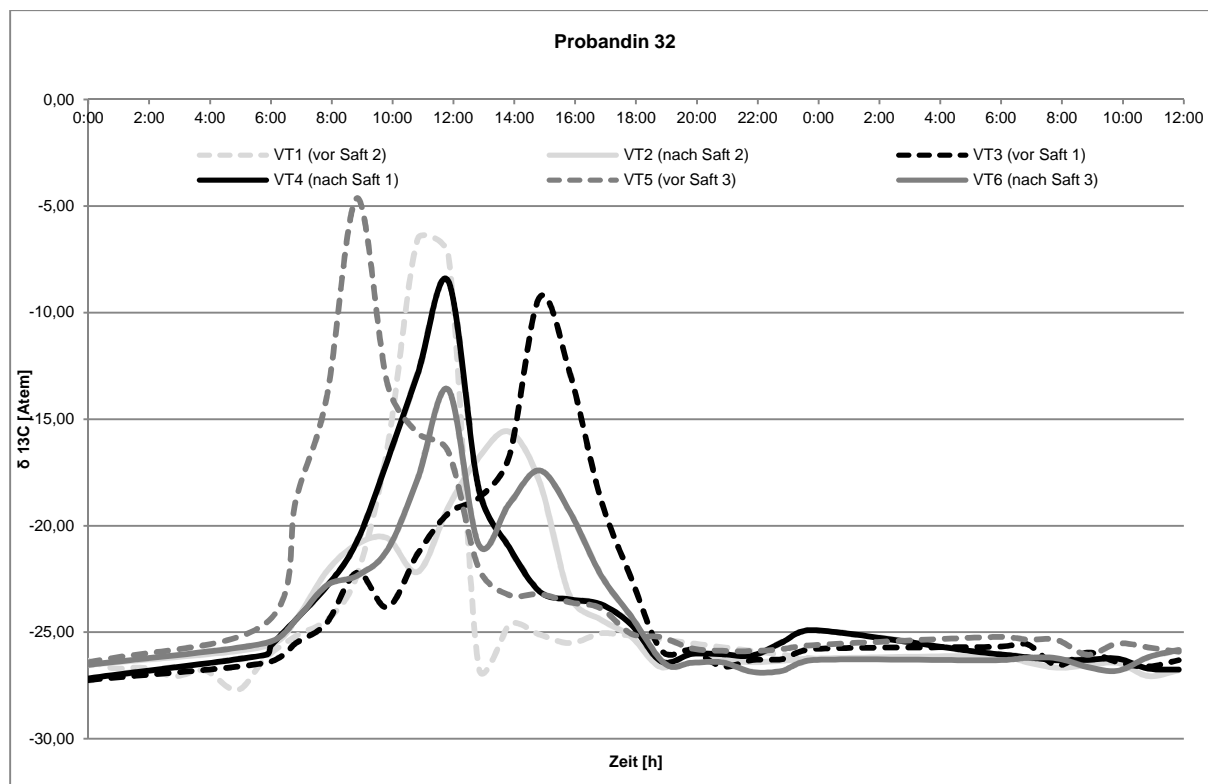


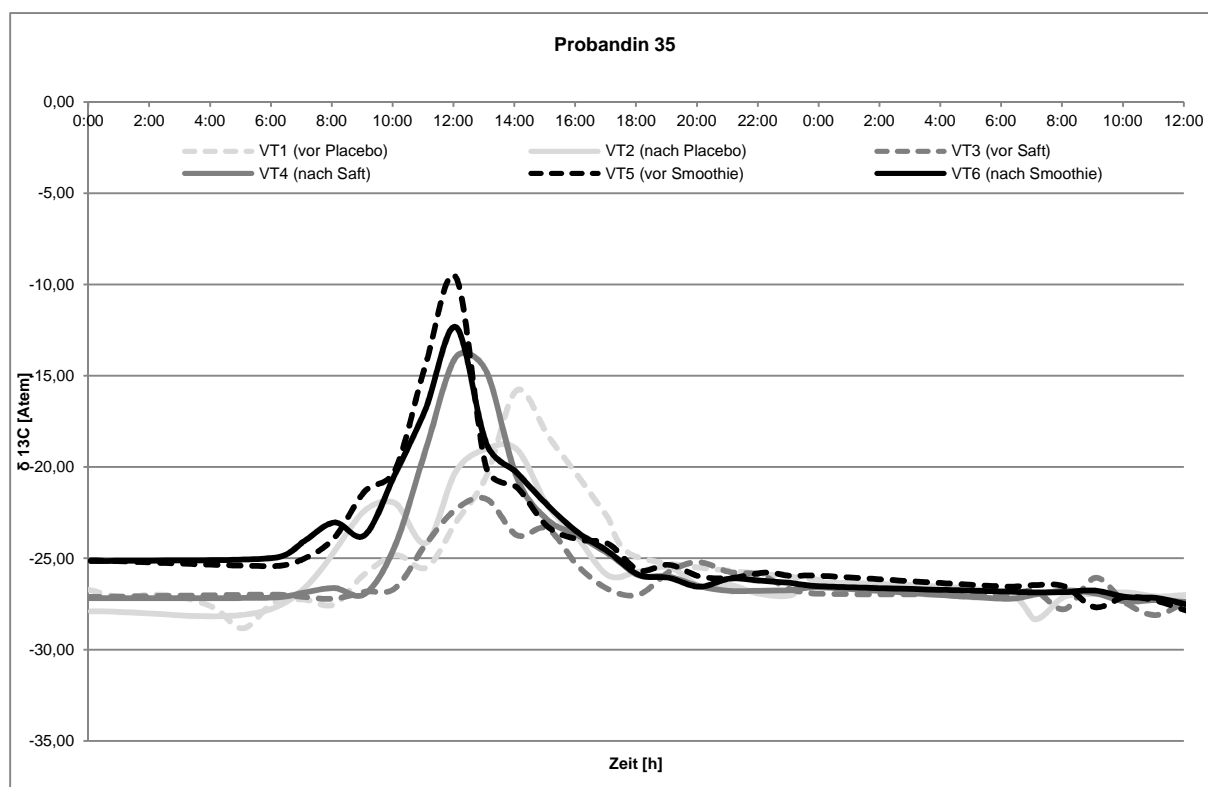
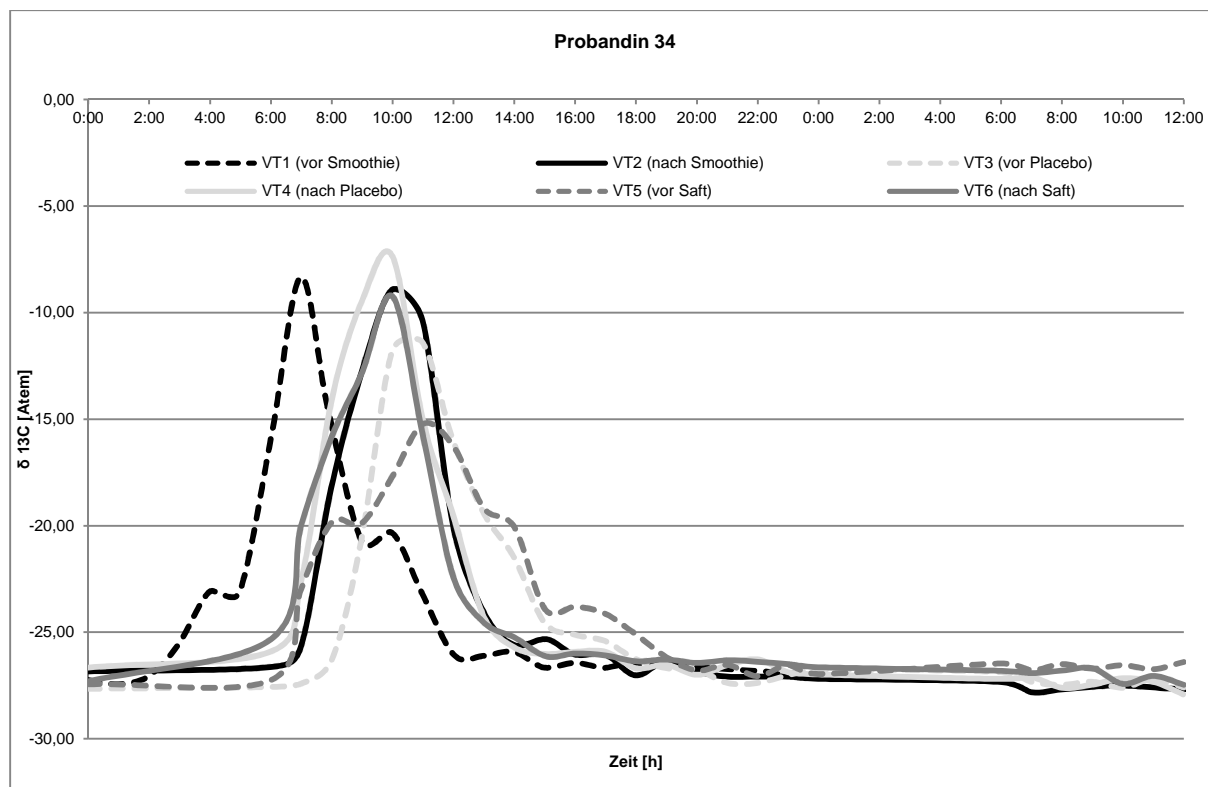


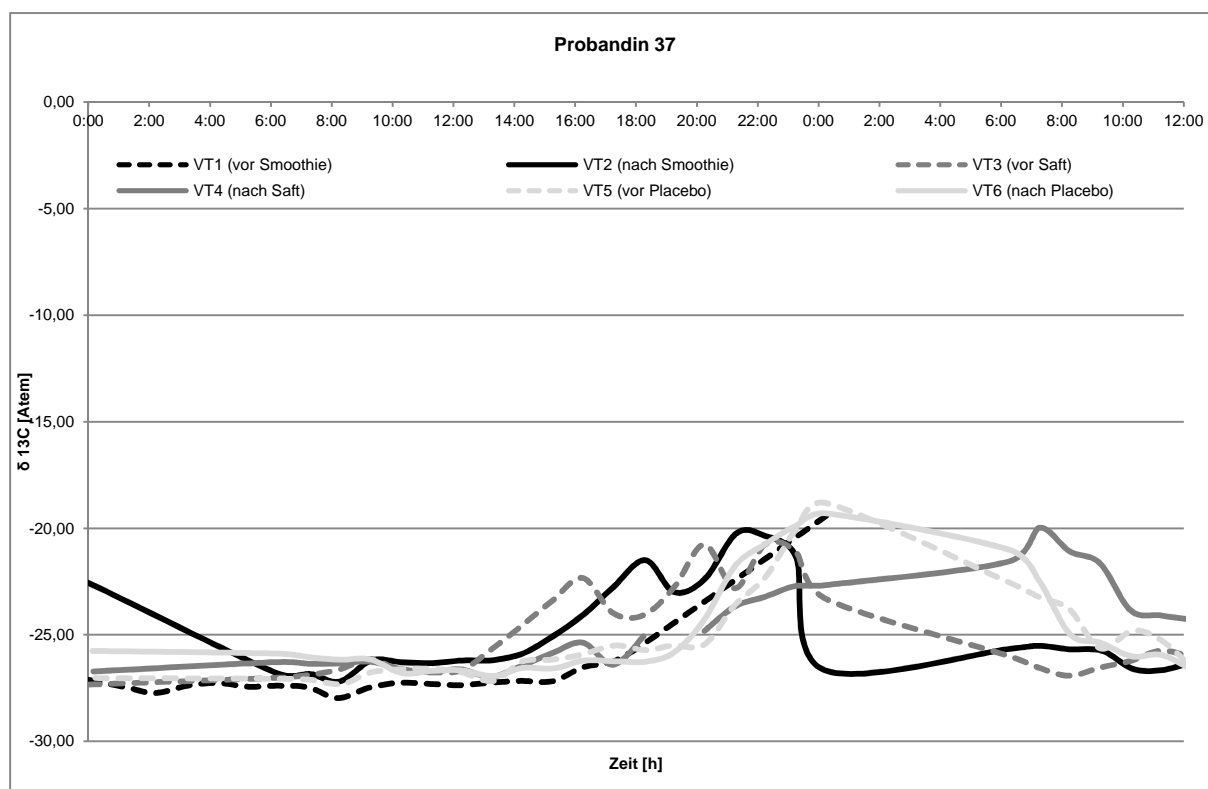
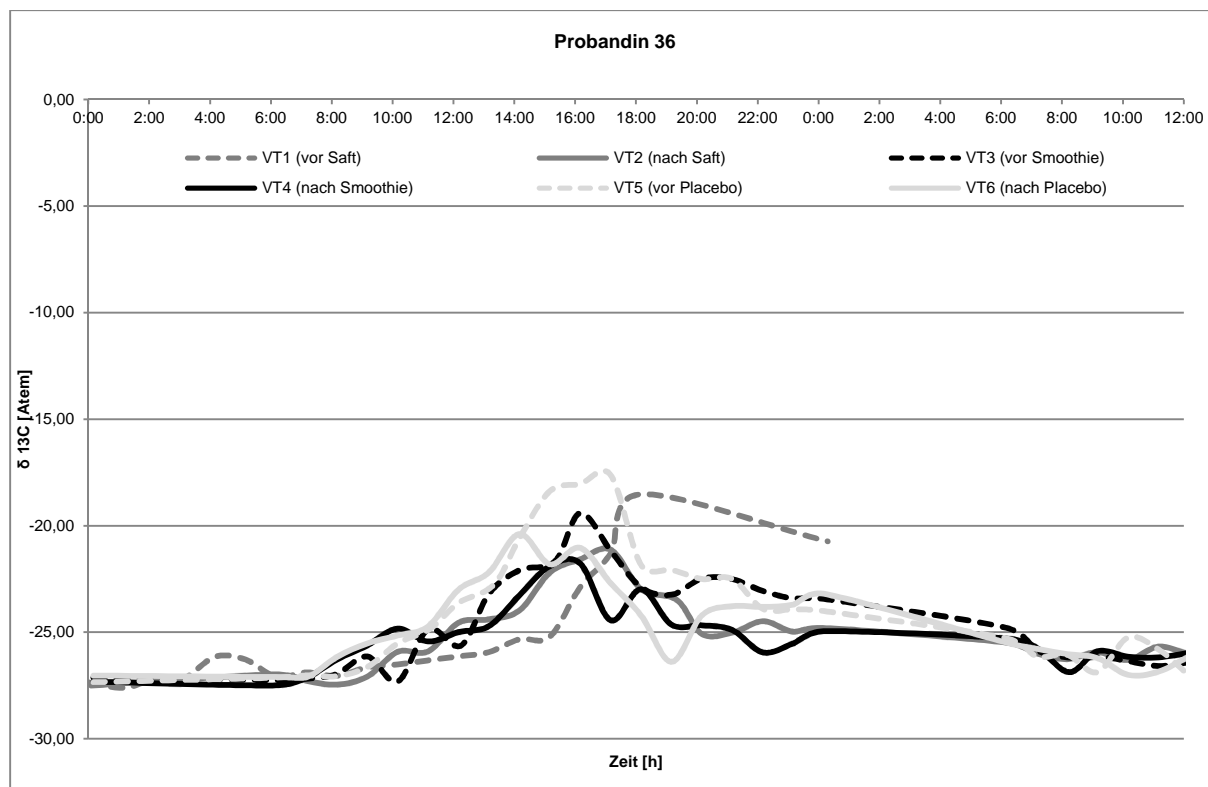


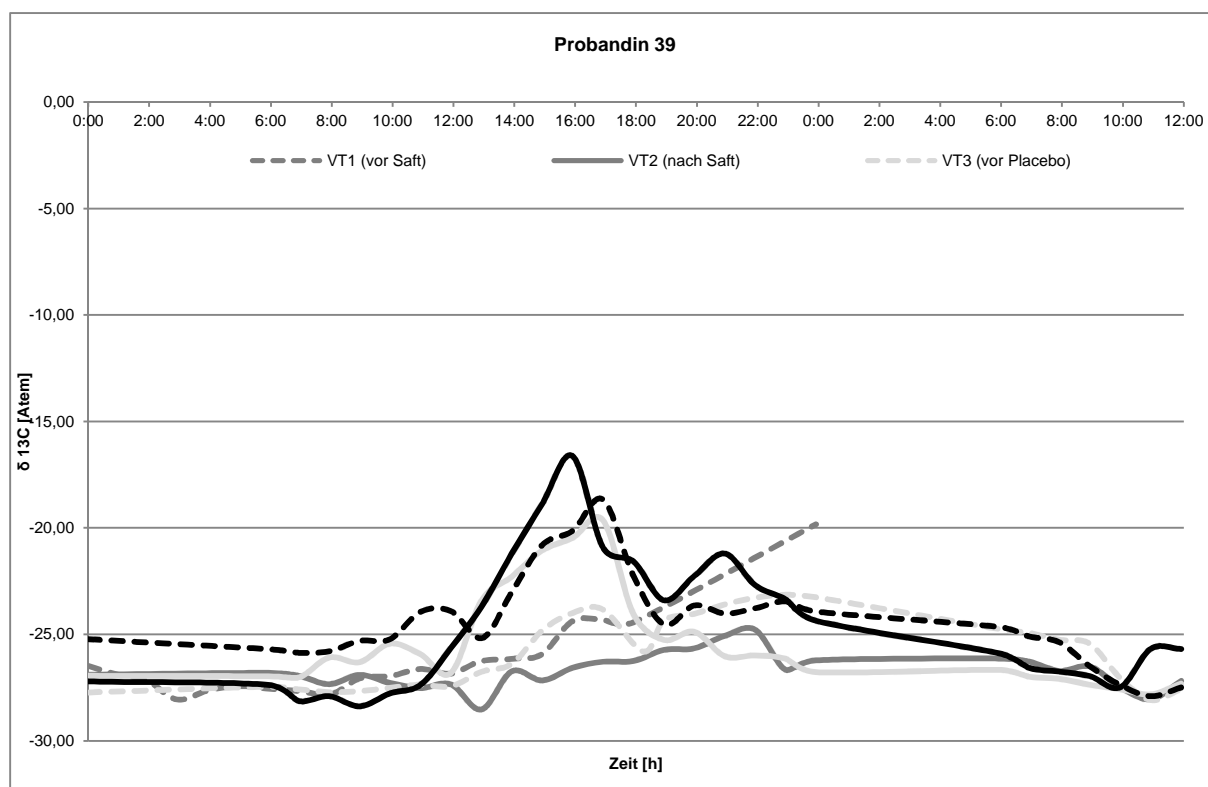
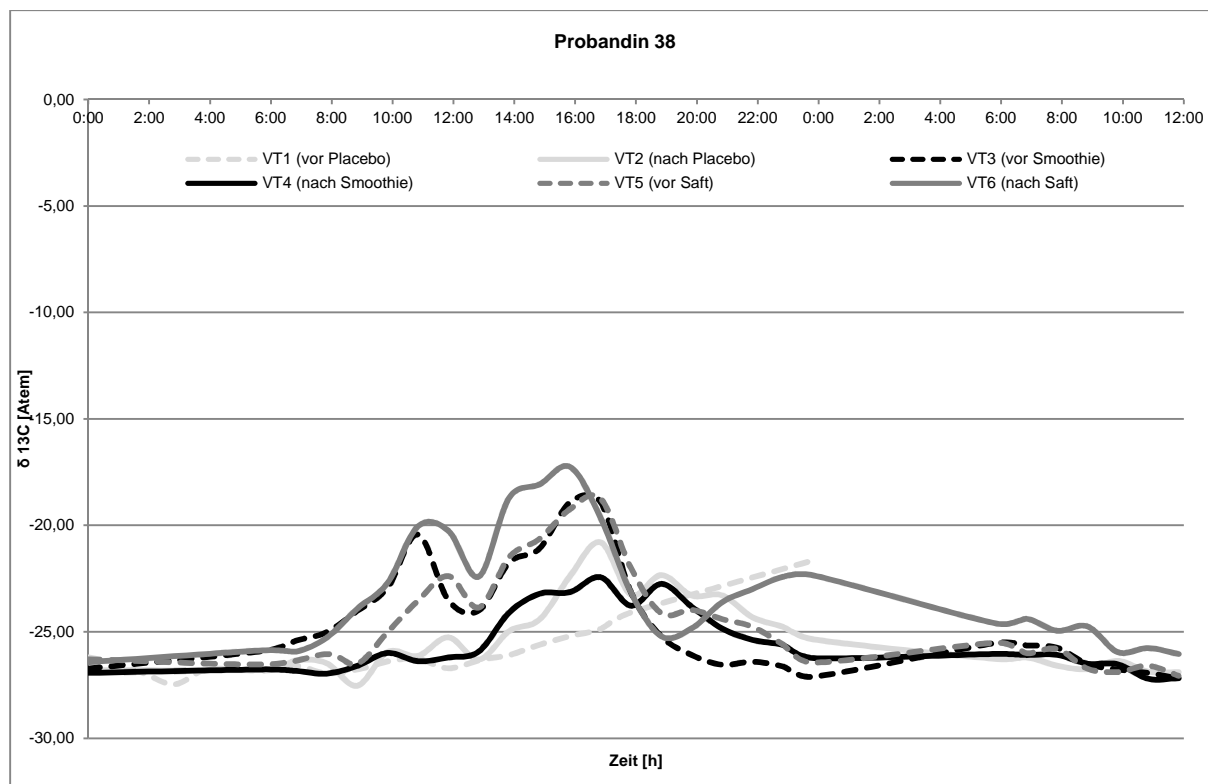












Tab. A-1 Kumulative ^{13}C -Ausscheidung (% Dosis) in der 0-6 h Urinfraktion der Probandinnen der Humanstudie I nach Aufnahme von 500 mg ^{13}C -LU an den Messtagen vor und nach den 14-tägigen Interventionsabschnitten mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (n = 30; grau hinterlegt = minimal/maximal gemessene Werte)

Probandin	^{13}C [% Dosis] 0-6 h Urinfraktion					
	Vor SM	Nach SM	Vor PL	Nach PL	Vor SA	Nach SA
10	2,9	5,3	4,5	2,5	5,3	5,0
11	3,7	0,8	5,7	2,9	2,7	2,0
12	1,8	3,4	2,6	1,8	11,6	2,3
13	4,3	3,0	4,2	1,3	3,1	3,0
14	1,6	3,8	3,9	5,8	1,7	1,8
15	5,0	1,9	1,8	4,7	4,5	5,2
16	12,8	3,5	3,6	4,8	3,3	2,5
17	0,4	1,2	24,6	1,5	1,3	2,6
18	4,4	4,3	3,5	3,2	5,2	3,6
19	3,8	3,8	2,5	2,3	2,1	3,1
20	4,7	0,6	2,9	0,0	1,2	2,4
21	0,1	4,5	2,5	2,3	16,3	2,8
22	3,6	5,4	2,4	5,7	2,9	2,5
23	1,1	2,6	21,0	1,9	2,2	2,4
24	1,6	2,4	2,2	2,5	4,2	5,2
25	14,9	3,4	2,1	5,7	3,2	3,9
26	2,6	3,9	9,3	5,4	2,9	3,2
27	0,8	4,3	2,1	2,5	9,4	2,7
28	2,2	2,7	1,3	2,6	3,9	2,8
29	2,0	1,9	2,4	1,6	0,5	1,2
30	0,5	2,1	2,9	1,2	4,3	5,2
31	8,8	2,3	4,2	0,9	3,7	2,4
32	1,0	1,9	2,3	2,3	1,8	1,3
33	2,5	3,7	4,1	3,9	12,8	2,9
34	4,9	3,4	3,4	3,8	2,8	4,6
35	1,5	3,3	0,6	3,8	1,4	3,7
36	2,5	2,7	1,9	3,3	2,2	5,8
37	9,5	2,6	3,0	0,3	2,6	2,0
38	2,1	2,4	1,7	2,5	1,4	3,1
39	1,3	3,3	1,6	2,5	8,7	0,0

Tab. A-2 Kumulative ^{13}C -Ausscheidung (% Dosis) in der 6-24 h Urinfraktion der Probandinnen der Humanstudie I nach Aufnahme von 500 mg ^{13}C -LU an den Messtagen vor und nach den 14-tägigen Interventionsabschnitten mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (n = 30; grau hinterlegt = minimal/maximal gemessene Werte)

Probandin	^{13}C [% Dosis] 6-24 h Urinfraktion					
	Vor SM	Nach SM	Vor PL	Nach PL	Vor SA	Nach SA
10	7,6	14,7	12,3	7,8	14,3	6,9
11	7,1	4,0	14,2	11,0	14,3	5,2
12	6,7	8,9	8,1	6,5	8,5	8,9
13	9,6	14,2	14,6	12,7	21,2	13,5
14	6,7	20,1	6,5	15,9	7,7	9,0
15	12,5	10,6	8,0	9,8	6,4	13,4
16	12,7	9,5	9,6	11,4	8,0	5,1
17	5,7	10,0	9,1	6,2	3,2	11,5
18	13,5	8,4	5,2	4,5	23,8	10,4
19	7,0	11,2	6,3	13,2	3,5	10,5
20	5,8	2,2	3,7	6,0	4,8	8,0
21	12,2	9,2	11,4	10,1	6,0	8,1
22	15,8	14,3	9,7	16,8	13,4	11,7
23	5,8	7,9	11,4	7,7	4,5	5,5
24	2,1	6,0	6,7	4,8	13,0	12,5
25	19,5	13,1	4,0	11,4	7,3	10,9
26	9,8	9,6	18,5	28,7	9,1	8,7
27	14,5	11,7	4,2	8,5	20,9	14,4
28	9,5	5,6	5,2	11,2	10,0	9,2
29	11,0	9,8	3,6	5,5	8,0	6,7
30	7,4	3,3	10,6	12,3	6,6	18,8
31	15,9	8,9	17,0	9,3	19,9	12,6
32	8,4	7,8	11,9	11,7	7,5	11,4
33	7,5	16,7	6,2	8,3	23,9	9,3
34	9,4	13,6	14,0	11,5	7,7	11,1
35	10,6	4,3	29,2	14,9	7,0	13,1
36	6,4	9,7	5,1	8,7	4,7	16,2
37	11,5	20,9	6,8	5,2	16,0	6,9
38	7,8	9,6	16,4	8,2	5,5	9,5
39	12,1	9,2	14,9	14,6	13,9	0,5

Tab. A-3 Kumulative ^{15}N -Ausscheidung (% Dosis) in der 0-6 h Urinfraktion der Probandinnen der Humanstudie I nach Aufnahme von 75 mg $^{15}\text{N}_2$ -LU an den Messtagen vor und nach den 14-tägigen Interventionsabschnitten mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (n = 30; grau hinterlegt = minimal/maximal gemessene Werte)

Probandin	^{15}N [% Dosis] 0-6 h Urinfraktion					
	Vor SM	Nach SM	Vor PL	Nach PL	Vor SA	Nach SA
10	3,4	5,2	3,5	2,5	4,0	1,9
11	10,4	1,7	5,5	3,3	3,0	4,4
12	3,2	3,8	3,4	2,0	11,3	3,2
13	4,3	3,6	5,2	1,9	3,6	3,7
14	2,3	4,2	3,8	5,3	2,4	3,6
15	6,5	5,7	2,7	5,4	5,8	5,7
16	12,9	5,6	4,3	4,6	4,5	3,0
17	2,0	0,6	29,2	2,1	2,3	3,1
18	5,9	5,8	4,4	3,7	5,8	4,0
19	4,6	4,2	3,7	2,6	2,3	3,6
20	6,7	1,0	4,4	1,8	2,3	3,1
21	0,7	4,9	3,0	2,4	18,6	4,1
22	4,4	7,4	2,6	6,3	4,0	2,9
23	1,9	3,7	31,1	3,4	2,8	3,3
24	2,1	2,6	1,9	2,7	4,1	7,4
25	18,4	5,2	2,8	6,5	3,2	5,5
26	3,1	4,0	10,0	6,8	3,6	4,6
27	1,3	4,4	3,3	2,5	8,7	5,1
28	1,4	2,6	1,6	2,0	3,9	2,7
29	2,9	2,3	2,5	2,2	0,6	1,7
30	0,9	1,9	3,8	1,2	4,9	6,6
31	11,1	3,7	6,2	1,9	4,1	2,6
32	1,8	2,8	2,6	2,8	1,8	1,7
33	3,0	5,0	5,5	5,6	12,9	3,7
34	4,8	3,1	3,4	3,8	2,4	5,2
35	3,7	3,8	0,6	5,2	3,2	4,1
36	2,9	2,9	1,9	2,1	1,5	5,4
37	9,5	3,0	3,6	0,3	4,3	2,9
38	3,1	2,2	2,3	3,1	2,0	3,7
39	2,0	3,7	2,6	4,3	13,0	1,5

Tab. A-4 Kumulative ^{15}N -Ausscheidung (% Dosis) in der 6-24 h Urinfraktion der Probandinnen der Humanstudie I nach Aufnahme von 75 mg $^{15}\text{N}_2$ -LU an den Messtagen vor und nach den 14-tägigen Interventionsabschnitten mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (n = 30; grau hinterlegt = minimal/maximal gemessene Werte)

Probandin	^{15}N [% Dosis] 6-24 h Urinfraktion					
	Vor SM	Nach SM	Vor PL	Nach PL	Vor SA	Nach SA
10	15,7	7,9	21,6	15,4	14,0	3,8
11	21,6	9,4	17,4	15,3	19,7	8,9
12	12,6	13,0	9,6	9,0	9,0	11,9
13	14,4	21,4	19,1	17,9	32,2	17,3
14	15,2	27,5	17,3	31,0	12,1	19,0
15	16,5	17,8	8,8	15,5	9,1	19,8
16	15,0	16,4	15,7	20,0	12,1	14,5
17	10,4	23,8	19,1	6,8	7,8	23,3
18	24,9	8,3	12,9	7,4	27,7	16,0
19	16,4	20,3	9,2	29,3	12,0	19,3
20	12,4	8,3	8,5	5,5	18,0	10,3
21	23,0	13,5	11,2	12,4	7,0	9,4
22	23,3	7,7	17,8	28,1	12,3	20,6
23	8,7	22,1	23,5	7,6	9,7	12,6
24	13,2	12,5	14,6	14,7	28,0	11,1
25	28,4	15,9	8,2	14,9	21,0	14,1
26	18,0	17,2	28,1	21,2	10,3	14,6
27	13,7	25,9	10,9	14,1	28,4	6,5
28	9,4	5,8	4,6	9,9	10,0	8,1
29	18,8	13,4	5,6	3,9	13,1	8,7
30	14,2	5,4	14,9	18,4	14,3	26,7
31	18,2	15,8	26,5	20,9	25,0	19,2
32	15,8	8,6	19,5	16,6	19,0	21,2
33	17,6	22,1	12,1	13,4	27,2	10,1
34	19,9	21,0	20,4	19,7	11,6	20,8
35	16,0	19,6	42,8	22,3	11,6	20,5
36	12,4	13,7	8,6	12,5	6,7	15,9
37	12,3	21,8	8,3	8,4	24,8	7,2
38	22,4	12,3	16,9	13,2	11,6	15,6
39	19,6	20,2	20,4	52,0	15,2	0,8

Tab. A-5 Kumulative p-Kresol-Ausscheidung (mg) in der 0-6 h Urinfraktion der Probandinnen der Humanstudie I an den Messtagen vor und nach den 14-tägigen Interventionsabschnitten mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (n = 30; grau hinterlegt = minimal/maximal gemessene Werte).

Probandin	p-Kresol [mg] 0-6 h Urinfraktion					
	Vor SM	Nach SM	Vor PL	Nach PL	Vor SA	Nach SA
10	9,5	3,9	2,7	3,0	3,9	2,6
11	4,5	1,5	8,9	3,6	2,4	11,6
12	3,6	6,3	2,8	2,0	2,4	4,3
13	7,7	3,8	8,5	3,1	2,2	11,1
14	4,0	7,4	17,0	10,8	7,0	9,4
15	3,8	4,7	0,7	5,7	1,9	7,5
16	2,9	2,5	1,8	7,1	3,0	2,8
17	0,9	0,9	10,5	1,3	1,7	1,2
18	9,7	6,4	7,6	5,5	3,0	6,3
19	33,9	28,7	27,2	13,2	12,6	18,5
20	29,2	13,6	3,2	3,4	9,8	4,1
21	5,2	3,2	2,7	1,8	8,3	7,8
22	11,0	3,5	12,5	8,6	7,5	2,5
23	5,2	11,1	10,2	11,5	6,4	7,6
24	9,6	17,9	6,7	13,2	15,8	11,3
25	3,6	11,5	5,7	1,3	2,9	4,6
26	3,3	3,3	7,0	5,8	1,9	0,7
27	1,3	6,2	5,8	7,3	8,3	3,6
28	1,7	2,4	0,3	2,3	1,8	0,2
29	18,9	0,6	8,2	3,1	4,4	2,8
30	7,3	2,3	2,2	5,8	4,1	8,3
31	3,8	4,2	1,9	0,3	2,5	1,0
32	10,3	13,0	19,0	23,5	7,8	2,8
33	2,8	3,8	1,6	2,6	5,8	0,6
34	2,9	5,9	5,8	2,9	6,0	2,1
35	6,2	10,9	25,5	22,7	6,6	17,0
36	15,7	5,2	0,5	7,7	1,8	3,5
37	19,6	7,4	4,1	4,3	9,9	4,3
38	4,6	0,9	0,8	1,7	0,8	2,1
39	5,3	3,2	4,9	3,3	7,6	3,8

Tab. A-6 Kumulative p-Kresol-Ausscheidung (mg) in der 6-24 h Urinfraktion der Probandinnen der Humanstudie I an den Messtagen vor und nach den 14-tägigen Interventionsabschnitten mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (n = 30; grau hinterlegt = minimal/maximal gemessene Werte).

Probandin	p-Kresol [mg] 6-24 h Urinfraktion					
	Vor SM	Nach SM	Vor PL	Nach PL	Vor SA	Nach SA
10	18,5	7,1	12,0	12,0	9,4	10,0
11	5,6	3,4	25,8	6,6	12,5	6,6
12	9,6	14,1	4,1	2,1	6,5	12,5
13	19,2	13,8	18,3	12,4	8,3	23,6
14	15,3	18,3	48,6	24,9	19,2	19,7
15	6,1	13,0	1,2	8,1	1,8	27,1
16	11,6	14,7	5,5	21,5	8,2	26,0
17	3,4	9,6	29,5	8,1	5,0	4,0
18	28,4	6,5	16,5	22,2	6,1	15,4
19	60,6	98,3	58,1	45,3	45,4	62,1
20	47,5	48,3	28,8	6,8	48,3	13,9
21	27,1	9,7	10,5	17,8	21,5	13,9
22	42,5	19,3	44,1	41,9	26,5	13,7
23	16,1	24,7	55,3	28,0	38,4	24,7
24	57,9	55,6	23,7	36,6	49,5	32,6
25	21,5	17,6	4,8	2,9	15,2	16,7
26	11,4	13,4	23,8	9,6	5,6	7,1
27	17,2	19,4	13,3	18,9	25,7	6,6
28	1,1	6,0	1,0	4,4	4,2	0,7
29	58,3	2,0	52,7	7,2	26,6	11,6
30	26,3	7,2	13,3	21,4	8,3	27,5
31	3,8	10,7	13,5	2,7	6,9	7,1
32	32,6	16,4	56,5	28,6	39,1	15,5
33	13,0	5,1	9,8	6,6	9,2	2,0
34	11,8	21,2	18,7	11,2	12,5	13,9
35	20,4	55,4	47,8	62,6	20,5	28,9
36	12,6	12,3	11,1	10,6	4,9	18,8
37	46,4	68,6	11,7	22,4	45,7	19,0
38	11,0	3,9	7,1	9,8	5,2	6,2
39	14,0	8,8	16,7	15,2	16,4	8,3

Tab. A-7 Acetatkonzentration in Stuhlproben ($\mu\text{mol/g TM}$) der Probandinnen der Humanstudie I an den Messtagen vor und nach den 14-tägigen Interventionsabschnitten mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (n = 30; TM = Trockenmasse; grau hinterlegt = minimal/maximal gemessene Werte; „leere“ Felder = fehlende Proben/Werte)

Probandin	Acetat [$\mu\text{mol/g TM}$]					
	Vor SM	Nach SM	Vor PL	Nach PL	Vor SA	Nach SA
10	196,1	213,0	42,1	152,2	182,5	13,8
11	30,5	6,7	167,7	61,8	40,4	90,1
12	50,1	50,4	113,6	18,9	218,7	157,1
13	44,5	15,4	61,7	4,5	17,3	22,9
14		61,6	125,8	34,2	33,6	9,6
15	149,9	11,4	53,3	101,0	216,2	159,1
16	275,2	264,4	32,6	55,3	458,6	11,9
17	37,2	5,3	106,5	81,2		216,4
18	64,6	4,6	4,8	4,6	29,7	43,7
19	42,2	27,0	26,9	3,9	9,2	77,7
20	631,2	48,4	5,9	4,3	34,5	9,0
21	9,1	5,8	32,9	177,3	235,8	153,6
22	209,5	131,7	30,4	289,5	6,5	18,0
23	10,3	9,7	765,5	101,4	27,2	154,0
24	42,0	163,6	5,9	3,3	244,7	41,5
25	12,1	101,9	5,9	6,1	21,8	57,4
26	46,8	201,9	160,1	174,5	5,0	5,4
27	7,7	10,0	31,2	218,6	115,6	212,4
28	220,1	165,4	34,3	393,7	6,3	27,5
29	3,9	8,3	61,3	61,1	16,5	293,3
30	7,6	5,5	9,9		226,8	12,6
31	124,7	108,3	21,7	14,0	32,5	269,1
32	9,0	274,9	36,3	87,3	5,1	4,9
33	8,7	9,3	63,2	239,2	158,4	115,5
34	61,4	79,7	25,7	106,9	6,1	6,0
35	8,6	9,0	279,3	28,0	39,7	80,7
36	23,9	24,5	4,9	5,0	118,8	59,0
37	70,9	80,0	6,1	5,5	24,5	48,7
38	25,4	95,1	548,7	137,5	8,2	3,9
39	11,6	13,3	53,2	124,2	202,3	111,2

Tab. A-8 Propionatkonzentration ($\mu\text{mol/g TM}$) in Stuhlproben der Probandinnen der Humanstudie I an den Messtagen vor und nach den 14-tägigen Interventionsabschnitten mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (n = 30; TM = Trockenmasse; grau hinterlegt = minimal/maximal gemessene Werte; „leere“ Felder = fehlende Proben/Werte)

Probandin	Propionat [$\mu\text{mol/g TM}$]					
	Vor SM	Nach SM	Vor PL	Nach PL	Vor SA	Nach SA
10	58,1	48,5	27,0	50,1	41,9	52,8
11	27,1	25,4	38,2	21,4	28,9	30,5
12	34,9	20,2	45,1	75,4	52,0	35,7
13	17,5	4,2	18,2	11,9	13,7	18,5
14		21,5	25,9	9,7	17,6	25,8
15	35,1	35,8	38,8	28,8	48,5	32,0
16	42,5	58,4	23,5	29,2	59,4	32,2
17	30,6	19,4	35,9	23,5		69,8
18	24,9	17,0	13,4	17,0	18,2	18,5
19	11,9	10,9	14,9	19,4	9,3	25,6
20	165,3	26,3	19,9	16,9	22,8	4,6
21	14,1	27,6	20,9	45,4	52,2	40,1
22	70,9	50,3	28,8	105,1	18,7	31,5
23	37,9	19,9	314,0	24,6	17,2	44,2
24	20,9	29,4	19,0	13,9	78,2	16,3
25	10,6	23,9	14,5	19,8	13,2	16,0
26	32,7	37,7	38,0	28,8	22,0	14,8
27	27,4	30,7	23,4	83,1	26,3	38,4
28	49,3	43,7	25,2	75,2	24,4	105,5
29	10,9	30,5	20,7	14,2	14,8	60,6
30	23,4	19,4	28,2		55,4	33,2
31	51,6	30,2	48,1	56,6	30,7	140,8
32	10,4	83,7	16,4	28,3	14,8	20,7
33	30,0	27,6	58,2	53,5	34,4	32,6
34	16,9	26,7	21,8	42,8	13,8	20,5
35	18,6	34,5	54,5	15,6	34,6	43,6
36	24,3	18,7	16,8	13,0	23,2	16,3
37	15,4	24,2	20,7	14,9	16,9	24,9
38	17,1	29,2	79,2	41,7	24,6	14,5
39	44,7	43,3	36,4	46,5	59,5	51,0

Tab. A-9 Butyratkonzentration ($\mu\text{mol/g TM}$) in Stuhlproben der Probandinnen der Humanstudie I an den Messtagen vor und nach den 14-tägigen Interventionsabschnitten mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (n = 30; TM = Trockenmasse; grau hinterlegt = minimal/maximal gemessene Werte; „leere“ Felder = fehlende Proben/Werte)

Probandin	Butyrat [$\mu\text{mol/g TM}$]					
	Vor SM	Nach SM	Vor PL	Nach PL	Vor SA	Nach SA
10	45,8	29,2	30,7	39,1	29,3	29,2
11	14,0	15,5	31,7	19,2	22,8	22,5
12	30,2	17,9	25,3	41,5	36,7	22,9
13	11,6	2,4	15,2	16,3	11,6	14,4
14		19,2	18,8	8,9	14,0	17,6
15	22,2	19,5	30,4	20,3	35,2	16,8
16	24,5	46,8	15,6	25,1	52,8	16,8
17	16,6	11,5	21,7	22,2		76,0
18	10,1	14,6	7,7	9,9	16,0	14,4
19	6,7	8,1	8,1	13,1	6,6	21,0
20	118,9	16,8	13,2	12,1	17,3	3,4
21	9,3	13,9	16,6	35,9	42,4	33,3
22	75,2	31,1	25,5	85,6	14,1	29,3
23	21,6	18,5	163,7	29,5	13,2	72,7
24	20,0	20,3	14,8	8,4	60,8	11,4
25	5,7	20,5	13,2	9,7	11,1	12,6
26	24,9	36,4	50,6	22,5	11,4	8,0
27	15,2	18,9	16,6	97,4	17,2	30,1
28	45,7	35,2	18,3	46,9	17,2	59,9
29	11,3	16,3	14,8	8,5	10,4	75,2
30	16,4	10,2	15,7		76,4	34,3
31	36,9	19,3	30,1	30,9	20,2	82,6
32	7,1	88,2	10,6	14,9	16,8	9,7
33	21,2	18,6	38,9	30,9	23,2	29,0
34	11,1	18,1	13,8	41,3	13,1	13,8
35	14,7	18,7	46,6	10,7	22,6	28,6
36	17,2	12,7	10,9	12,8	13,2	10,4
37	10,2	19,0	12,5	14,1	12,5	15,5
38	12,7	20,7	63,4	32,1	14,4	8,6
39	31,2	20,3	26,0	31,3	28,5	18,4

Tab. A-10 Isobutyratkonzentration ($\mu\text{mol/g TM}$) in Stuhlproben der Probandinnen der Humanstudie I an den Messtagen vor und nach den 14-tägigen Interventionsabschnitten mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (n = 30; TM = Trockenmasse; grau hinterlegt = minimal/maximal gemessene Werte; „leere“ Felder = fehlende Proben/Werte)

Probandin	Isobutyrat [$\mu\text{mol/g TM}$]					
	Vor SM	Nach SM	Vor PL	Nach PL	Vor SA	Nach SA
10	0,3	0,9	25,8	14,6	59,4	
11	7,2	24,8	13,8	0,5	3,2	12,8
12	14,4	5,6		6,2	6,6	2,1
13			12,0	9,7	4,9	
14			9,1	9,4	125,7	
15		13,9	7,7	9,5	2,4	2,2
16	4,6	3,5	8,5	10,0	21,0	152,4
17		2,5	0,9	20,9		122,8
18	61,7	19,8	4,6	7,8	5,5	
19	5,6	9,3	25,5	20,0	2,5	18,6
20	4,9	2,4	3,5	11,7	25,7	0,4
21	11,0	9,9	2,1	25,9	6,9	2,6
22	144,5	5,3	16,1	16,2	122,1	27,0
23	11,9	4,2	5,1	32,9	10,2	31,1
24				13,4	103,6	
25	1,6	10,6	7,7	3,2	8,5	27,9
26	8,9	29,6	20,4		8,7	7,9
27	16,3	25,5		3,6	50,0	9,3
28	1,5	0,2	5,1	0,0	7,9	
29	22,8	27,8		5,6	1,3	18,8
30	9,5	7,1	2,1		29,1	40,9
31	7,0	33,2	0,0	2,8	5,6	95,5
32	12,8	84,4	41,6	8,6	55,4	
33	5,5	4,6	4,2	17,6	5,6	10,8
34		1,5	40,3	9,2	26,9	8,7
35	11,3	5,7	2,3	0,5	6,8	67,9
36	28,0	9,5		30,1	7,3	4,7
37	3,8	21,1	43,8	7,0	9,4	
38	14,4	1,6	3,8	4,6	0,4	9,1
39		1,9	0,0	4,2	4,8	0,0

Tab. A-11 Isovaleratkonzentration ($\mu\text{mol/g TM}$) in Stuhlproben der Probandinnen der Humanstudie I an den Messtagen vor und nach den 14-tägigen Interventionsabschnitten mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (n = 30; TM = Trockenmasse; grau hinterlegt = minimal/maximal gemessene Werte; „leere“ Felder = fehlende Proben/Werte)

Probandin	Isovalerat [$\mu\text{mol/g TM}$]					
	Vor SM	Nach SM	Vor PL	Nach PL	Vor SA	Nach SA
10	3,4	6,5	10,4	16,8	11,4	
11	1,8	38,1	26,9	4,1	10,9	10,6
12	12,2	5,9		7,1	13,6	13,8
13			11,7	19,2	3,1	
14			35,4	34,5	130,7	
15		14,3	7,4	15,7	16,3	19,7
16	22,2	21,8	6,0	2,8	19,5	120,1
17		3,1	11,2	36,3		58,5
18	74,9	27,2	5,4	9,4	4,8	
19	11,7	23,3	18,0	30,0	4,0	23,2
20	13,7	8,1	1,4	40,7	14,0	0,6
21	25,4	17,3	3,0	15,8	9,4	3,3
22	142,4	13,8	29,0	24,8	19,2	35,9
23	38,8	12,4	39,5	67,6	6,2	27,6
24				8,7	138,6	
25	1,8	15,3	11,9	5,9	6,4	31,5
26	5,8	31,2	53,3		10,7	6,9
27	23,6	29,0		5,5	69,5	14,4
28	3,4	2,3	4,2	2,9	13,5	
29	19,5	26,2		18,6	3,0	21,0
30	15,5	9,2	4,0		24,9	42,7
31	17,1	48,5	15,3	8,3	4,5	35,0
32	9,5	49,8	42,9	20,3	54,2	
33	9,3	4,5	8,2	14,6	12,5	21,6
34		7,1	11,6	18,2	14,0	13,7
35	27,3	4,7	6,0	3,4	15,9	60,9
36	15,3	15,3		45,8	18,8	9,6
37	7,5	52,6	36,9	13,4	6,4	
38	9,0	6,2	8,2	12,9	0,4	18,0
39		2,7	2,7	5,9	12,8	8,8

Tab. A-12 Valeratkonzentration ($\mu\text{mol/g TM}$) in Stuhlproben der Probandinnen der Humanstudie I an den Messtagen vor und nach den 14-tägigen Interventionsabschnitten mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (n = 30; TM = Trockenmasse; grau hinterlegt = minimal/maximal gemessene Werte; „leere“ Felder = fehlende Proben/Werte)

Probandin	Valerat [$\mu\text{mol/g TM}$]					
	Vor SM	Nach SM	Vor PL	Nach PL	Vor SA	Nach SA
10	5,1	6,8	32,4	6,9	7,6	
11	2,8	7,1	1,3	12,1	16,8	4,3
12	7,8	0,9		14,1	15,1	2,5
13			10,1	6,4	2,0	
14			5,8	0,4	5,3	
15		1,5	4,8	1,6	0,6	0,0
16	5,0	4,5	2,2	2,1	9,4	5,2
17		3,0	0,7	0,0		6,0
18	0,9	0,0	2,6	12,6	6,3	
19	2,2	1,7	0,9	1,6	5,8	2,8
20	33,6	0,0	0,7	0,3	13,4	1,5
21	28,0	2,3	5,0	10,4	12,2	3,9
22	110,2	6,8	34,6	16,6	30,5	16,0
23	6,1	3,7	34,9	6,0	4,5	11,4
24				3,4	16,6	
25	1,4	18,0	10,5	7,2	3,2	1,3
26	18,5	5,5	2,6		8,9	6,1
27	14,6	6,9		4,1	0,5	15,3
28	5,5	4,7	9,3	3,6	14,0	
29	3,7	3,7		1,1	3,6	7,9
30	5,6	5,9	9,0		6,6	31,0
31	13,8	2,2	11,9	12,6	7,5	14,5
32	8,3	5,2	2,5	1,1	9,7	
33	6,5	3,4	9,9	2,3	2,4	4,8
34		5,7	7,6	4,9	8,5	3,1
35	6,6	5,5	4,2	5,2	16,5	15,3
36	6,2	0,8		5,6	6,6	3,5
37	3,8	9,4	0,5	10,8	4,3	
38	7,0	3,9	9,7	9,9	0,4	1,7
39		1,3	9,1	0,9	4,0	1,8

Tab. A-13 pH-Wert in Stuhlproben der Probandinnen der Humanstudie I an den Messtagen vor und nach den 14-tägigen Interventionsabschnitten mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (n = 30; grau hinterlegt = minimal/maximal gemessene Werte; „leere“ Felder = fehlende Proben/Werte)

Probandin	pH-Wert					
	Vor SM	Nach SM	Vor PL	Nach PL	Vor SA	Nach SA
10	6,47	5,57	6,91	5,08	5,4	5,3
11	8,79	6,28	6,18	8,84	7,53	5,46
12	7,58	6,48	6,33	5,29	6,29	6,95
13	9,29	9	6,8	6,08	7,56	8,39
14		6,75	6,83	8,92	8,19	7,72
15	6,88	6,18	7,73	6,14	7,3	6,13
16	4,8	5,16	6,8	8,81	5,94	8,38
17	5,33	7,07	8,1	9,14		8,23
18	8,29	8,17	7,93	7,1	6,45	6,67
19	7,3	7,5	6,45	7,89	6,86	7,08
20	4,97	9,04	8,92	7,84	7,36	8,51
21	6,34	7,37	6,26	5,42	5,91	5,38
22	7,45	7,08	7,59	6,44	6,55	6,79
23	6,37	6,29	6,53	7,31	6,73	6,4
24	6,85	6,12	6,31	6,52	8,12	8,54
25	8,74	5,61	5,89	5,14	6,26	8,53
26	7,32	6,67	8,25	6,44	6,6	7,34
27	7,46	8,29	6,19	6,34	7,48	6,39
28	5,22	4,89	6,87	5,37	5,53	5,36
29	6,62	6,55	7,41	6,51	7,01	6,68
30	6,39	7,48	6,8		7,26	6,53
31	6,13	7,5	5,69	5,17	7,47	6,11
32	7,48	6,97	8,48	7,72	7,11	6,27
33	5,22	6,7	7,14	7,79	6,75	6,3
34	6,83	5,28	7,22	6,66	6,64	5,91
35	6,44	5,75	5,52	8,54	8,09	7,28
36	8,2	8,4	5,6	7,18	6,14	5,89
37	6,01	6,85	6,87	6,7	6,64	6,68
38	7,44	4,59	4,97	5,69	8,1	6,38
39	5,72	5,47	6,63	5,62	6,15	8,26

Tab. A-14 Gesamtkeimzahlen (KbE/g TM) in Stuhlproben der Probandinnen der Humanstudie I an den Messtagen vor und nach den 14-tägigen Interventionsabschnitten mit Smoothie (SM), Saft (SA) und Placebo (PL) (n = 30; KbE = Koloniebildende Einheiten; TM = Trockenmasse; grau hinterlegt = minimal/maximal gemessene Werte „leere“ Felder = fehlende Proben/Werte)

Probandin	Gesamtkeimzahl [KbE/g TM]					
	Vor SM	Nach SM	Vor PL	Nach PL	Vor SA	Nach SA
10	2,15E+07	9,74E+07	6,43E+07	6,21E+07	5,55E+07	4,23E+07
11	1,10E+08	1,83E+07	2,34E+07	7,43E+07	3,48E+07	1,62E+07
12	7,13E+07	9,46E+06	6,47E+07	7,92E+07	9,42E+07	5,05E+07
13	6,21E+06	6,49E+06	5,81E+07	3,58E+07	1,33E+07	1,03E+07
14		1,08E+07	2,88E+07	4,30E+07	7,56E+07	5,07E+07
15	1,01E+08	1,64E+08	4,30E+07	5,02E+07	1,59E+07	4,31E+07
16	5,19E+07	1,22E+08	1,96E+07	7,08E+07	1,11E+08	1,05E+08
17	2,19E+08	6,23E+07	2,17E+07	7,54E+07		2,45E+07
18	7,25E+07	4,51E+07	3,16E+07	1,99E+07	5,75E+06	1,49E+07
19	2,04E+07	1,76E+07	8,13E+07	4,31E+07	1,22E+07	3,44E+07
20	5,77E+07	3,80E+07	8,51E+07	1,12E+08	1,89E+07	8,14E+06
21	1,92E+07	4,54E+07	5,44E+07	3,31E+07	3,79E+07	6,46E+07
22	3,62E+06	2,99E+07	3,13E+07	6,74E+07	7,41E+07	1,34E+08
23	8,43E+07	4,20E+07	2,45E+08	2,84E+07	1,29E+07	1,58E+07
24	7,28E+07	3,58E+07	6,49E+07	5,91E+07	6,74E+07	1,43E+07
25	1,24E+06	1,53E+07	4,80E+07	2,92E+07	8,67E+06	2,69E+07
26	5,70E+07	2,28E+07	3,87E+07	4,70E+07	2,65E+07	2,33E+06
27	8,30E+07	1,31E+08	3,67E+07	2,95E+07	1,42E+07	3,05E+07
28	5,60E+07	6,64E+07	4,12E+07	4,36E+07	4,51E+07	3,16E+08
29	7,72E+07	9,37E+07	3,50E+07	4,64E+07	2,29E+07	3,70E+07
30	2,17E+07	1,09E+08	3,76E+07		3,91E+07	1,08E+08
31	4,09E+07	7,63E+07	7,53E+07	1,21E+08	3,51E+07	2,99E+07
32	2,60E+07	1,40E+07	1,50E+07	5,47E+07	3,59E+07	5,42E+07
33	4,70E+07	7,79E+07	2,03E+07	3,98E+07	5,58E+07	3,95E+07
34	3,82E+07	2,59E+07	2,57E+07	2,05E+07	2,87E+07	2,48E+07
35	2,14E+07	7,15E+07	2,45E+07	1,43E+07	1,45E+07	2,50E+07
36	3,15E+07	1,63E+07	2,77E+07	8,25E+07	2,11E+07	7,43E+06
37	2,69E+07	2,40E+07	9,16E+07	4,88E+07	1,52E+07	1,36E+07
38	1,47E+07	2,20E+07	9,08E+07	4,89E+07	1,02E+08	7,24E+07
39	3,36E+07	1,42E+08	2,39E+07	3,35E+07	3,86E+07	3,16E+07

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und noch nicht veröffentlicht.

Gießen, den 11.04.2014

Georg Abel